

**Quantitative Analyse der zirkulierenden Tumorzellen im
peripheren Blut zur Überwachung der adjuvanten
Chemotherapie bei Patientinnen mit primärem Brustkrebs**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Nele Malarski

geboren am 01.11.1982 in Heiligenstadt

Universität Jena

Gutachter:

1. Frau PD Dr. med. K. Pachmann (Jena)
2. Herr Prof. Dr. med. I. B. Runnebaum (Jena)
3. Frau Prof. Dr. med. T. Fehm (Tübingen)

Tag der öffentlichen Verteidigung: Jena, der 22.11.2011

0 Abkürzungsverzeichnis

In der nachfolgenden Tabelle 1 sind die in der Dissertation verwendeten Abkürzungen mit ihren Erläuterungen aufgelistet.

Tabelle 1: Abkürzungen mit deren Erläuterungen

Abkürzung	Erläuterung
AC	Adriamycin, Cyclophosphamid
BRCA 1	Breast cancer 1
BRCA 2	Breast cancer 2
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CHEK 2	Check point kinase 2
CMF	Cyclophosphamid, Methotrexat, Fluorouracil
D	Docetaxel
DNA	Desoxyribonukleinsäure (A=acid)
EC	Epirubicin, Cyclophosphamid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül
ER	Estrogen Receptor
FAC	Fluorouracil, Adriamycin, Cyclophosphamid
FEC	Fluorouracil, Epirubicin, Cyclophosphamid
FcR	Fc Receptor
HEA-FITC	Human Epithelial Antigen
Her/2neu	Human epithelial growth receptor2
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
KO	Körperoberfläche
LSC	Laser Scanning Cytometer
µl	Mikroliter
m ²	Quadratmeter
M	Metastasen

mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
N	Nodalstatus
P	Paclitaxel
RNA	Ribonukleinsäure
T	Tumorgröße
TAC	Docetaxel, Adriamycin, Cyclophosphamid
TC	Docetaxel, Cyclophosphamid
U/min	Umdrehungen/Minute
ZTZ	Zirkulierende Tumorzellen

1 Inhaltsverzeichnis

0	Abkürzungsverzeichnis	1
1	Inhaltsverzeichnis	3
2	Vorwort der Dissertation	4
3	Zusammenfassung der Dissertation	5
4	Einleitung	7
5	Thesen der Dissertation	11
6	Zielstellung und Aufgabenpakete	12
7	Methodik	13
7.1	Patientenauswahl	13
7.2	Therapie	13
7.2.1	Adjuvante Chemotherapie	13
7.2.2	Chemotherapeutika	14
7.2.3	Chemotherapieschemata	15
7.3	Materialien und Geräte	16
7.3.1	Gerät	16
7.3.2	Antikörper & Chemikalien	16
7.4	Methode	17
7.4.1	Probengewinnung	17
7.4.2	Blutaufbereitung (MAINTRAC®)	17
7.4.3	Laser Scanning Cytometer®	18
7.4.4	Statistik	20
8	Ergebnisse	21
8.1	Patientendaten	21
8.2	Auswertung	21
8.2.1	Tumorzellzahlverhalten	21
8.2.2	Rezidivrate in Bezug zum Tumorstadium und Prognosefaktor	24
8.2.3	Tumorzellzahlverhalten in Bezug zur Rezidivrate	25
9	Diskussion	33
10	Schlussfolgerung	43
11	Ausblick	45
12	Literaturverzeichnis	46
13	Anhang der Dissertation	55
	Tabellen	55
	Abbildungsverzeichnis	60
	Tabellenverzeichnis	61
	Lebenslauf	62
	Danksagung	63
	Eidesstattliche Erklärung	64

2 Vorwort der Dissertation

In memoriam memoriae

Die Erinnerung ist eine mysteriöse Macht und bildet die Menschen um.

Wer das, was schön war, vergisst, wird böse.

Wer das, was schlecht war, vergisst, wird dumm.

Erich Kästner

Erich Kästner erkannte wahrhaft, dass die Erinnerung einen Menschen umbildet und dass man weder schlechte noch gute Ereignisse vergessen soll.

Dieses passende Zitat lässt sich auch auf die Forschung anwenden. Wie weit es die Forschung in der Medizin und in den Naturwissenschaften in den letzten Jahren gebracht hat, grenzt fast an ein Wunder. Die zum Teil revolutionären Ergebnisse der Forschung in der Medizin und in den Naturwissenschaften in den letzten Jahren können nur mit tiefem Respekt gewürdigt werden.

Dennoch sollten wir uns weder auf den neuen Errungenschaften ausruhen, noch die Schattenseiten ausblenden.

Insofern hat mich das Zitat von Erich Kästner beim Schreiben der vorliegenden Dissertation sehr angesprochen.

3 Zusammenfassung der Dissertation

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass maligne Zellen im Kreislauf von Karzinompatienten zirkulieren können. Der heutige Wissensstand geht davon aus, dass sich diese Zellen in den Organen absiedeln und zu Metastasen führen können. In einer Reihe von Studien wurde versucht, disseminierte Tumorzellen im Knochenmark und im peripheren Blut zu detektieren und herauszufinden, welche Rolle sie bei der Metastasenentstehung spielen.

Das Mammakarzinom zählt heute zu den häufigsten Krebserkrankungen der Frau und gehört zu den Malignomen, die früh Zellen in den Kreislauf schwemmen. Deswegen ist es wichtig diese Krankheit in all ihren Einzelheiten zu verstehen.

Um Restzellen des Tumors zu eliminieren, wurde die adjuvante Chemotherapie eingeführt und gezeigt, dass diese die rezidivfreie Überlebenszeit und das Gesamtüberleben signifikant verlängert.

Doch trotz der Chemotherapie treten bei 50 Prozent der Patientinnen, die bei Erstdiagnose keinen Hinweis auf Metastasen hatten, innerhalb der ersten fünf Jahre Rezidive auf (Taubert, 2004). Bis dato konnte keine Studie nachweisen, ob die individuelle Patientin von der Therapie profitiert (Grogan, 2002; Loprinzi, 2001).

Um diese Frage zu beantworten, beschäftigte sich die vorliegende Studie mit der Bestimmung der Zahl zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut bei Patientinnen mit primärem Brustkrebs unter adjuvanter Chemotherapie. Zur Messung der epithelialen Tumorzellen im peripheren Blut wurde die MAINTRAC® Methode angewandt, bei der die Messung der Zellen mit dem Laser Scanning Cytometer erfolgt.

Drei Gruppen konnten in ihrem Verhalten der Zellen während der Chemotherapie unterschieden werden:

1. Patientinnen mit Abfall der Zellzahl um mehr als das zehnfache,
2. Patientinnen mit geringer Änderung (kleiner als das zehnfache) und
3. Patientinnen mit Anstieg der Zellzahl um mehr als das zehnfache.

Es stellte sich heraus, dass von 91 Patientinnen zwanzig im Beobachtungszeitraum von Januar 2002 bis Dezember 2005 rezidierten. In der ersten Gruppe (insgesamt 28 Patientinnen) hatte nur eine Patientin ein Rezidiv zu verzeichnen. In der 2. Gruppe (insgesamt 30 Patientinnen) traten bei 5 Patientinnen Rezidive auf und in der 3. Gruppe (insgesamt 33 Patientinnen) traten 14 Rezidive auf.

Damit konnte die These belegt werden, dass das Verhalten der zirkulierenden Tumorzellen mit der rezidivfreien Überlebenszeit korreliert und dass damit eine Aussage über den Überlebensvorteil der individuellen Patientin durch die Chemotherapie getroffen werden kann. Die Zunahme der Zahl zirkulierender Tumorzellen unter der Therapie kann als Prognosefaktor für das Auftreten eines Rezidivs gewertet werden, da das Rezidivrisiko signifikant mit dem Anstieg der Tumorzellzahl einhergeht. Trotzdem ist zu beachten, dass bei einer vorübergehend niedrigen Zellzahl oder einem Abfall der Zellen unter die Nachweisgrenze, die Entstehung eines Rezidivs nicht ausgeschlossen werden kann.

Für die Zukunft ist zu wünschen, dass Folgestudien für Patientinnen initiiert werden, die keinen Gewinn aus der Chemotherapie ziehen, um eventuell neue Therapiestrategien zu entwickeln.

4 Einleitung

In der Tumorthherapie sind mit der Einführung der systemischen Chemotherapie neue Behandlungsmöglichkeiten erschlossen worden.

Doch trotz der Behandlung mit neu entwickelten Chemotherapeutika sterben in Deutschland bei 45.000 Neuerkrankungen pro Jahr rund 18.000 Frauen jährlich an Brustkrebs. Der Brustkrebs zählt somit zu den häufigsten Krebstodesursachen bei der weiblichen Bevölkerung in Deutschland (Becker, 2001), wie auch in Großbritannien (Earl, 2004). Als Folge eines Mammakarzinoms sind jährlich 300.000 Todesfälle weltweit zu verzeichnen (Chambers, 2000).

Somit erkrankt ca. jede zehnte Frau an diesem malignen Tumor. Alter und das weibliche Geschlecht sind vor hormonellen Faktoren, Lebensumständen und Umweltfaktoren die größten Risikofaktoren zur Entstehung eines Mammakarzinoms. Zudem sind Frauen mit Mutationen in den Genen BRCA1 und BRCA2 mit einem sehr hohem Risiko behaftet (Antoniou, 2005; King, 2003), jedoch nur 5-10% der diagnostizierten Brustkrebsfälle lassen sich auf diese vererbten Mutationen zurückführen (Langston, 1996; Newman, 1998; Peto, 1999). Neben diesen spielen auch andere Genmutationen wie zum Beispiel CHEK2 (Shaag, 2005) eine Rolle.

Diese Zahlen machen die Notwendigkeit eines verbesserten Verständnisses und daraus folgend Weiterentwicklungen der Therapie- und Diagnosemöglichkeiten offensichtlich. Die Vielzahl der durchgeführten und publizierten Studien zeigt die aktive Forschungstätigkeit auf diesem Gebiet. Im Folgenden werden die wichtigsten Studien und ihre Ergebnisse aufgeführt.

Eine Vielzahl der Patientinnen weist zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in den klinischen, radiologischen und laborchemischen Routineuntersuchungen keine Metastasen auf. Das Tumorstadium wird nach TNM klassifiziert (siehe Tabelle 10, Tabelle 11 und Tabelle 12).

Obwohl frühe Diagnosestellung, Operation und die Einführung der adjuvanten Chemotherapie die rezidivfreie Überlebenszeit verlängert haben, sind Rezidive nicht selten (Jones, 2005).

Die adjuvante Chemotherapie zielt darauf ab, nach der Operation vermutete Tumorreste und Mikrometastasen zu behandeln. Inzwischen ist nachgewiesen, dass sie die rezidivfreie Zeit tatsächlich verlängern kann (Lalle, 2000; Racila, 1998).

Jedoch treten nach Tumoresektion und anschließender Chemotherapie noch bei 50 Prozent der Patientinnen mit M0 Metastasen auf (Bauer, 2002; Bischoff, 2003; Kvalheim, 1996; Taubert, 2004). 30 Prozent der Lymphknoten negativen Patientinnen entwickeln innerhalb der nächsten fünf Jahre Metastasen (Pantel, 2004; Zieglschmid, 2005).

Der erste Gipfel der Rezidiventstehung prämenopausaler Patientinnen findet sich acht bis zehn Monate nach der Operation, der zweite nach 28-30 Monaten. Bei postmenopausalen Patientinnen ist das Risiko des Auftretens eines Rezidivs zwischen dem 18. und 20. Monat am höchsten (Demicheli, 2004; Earl, 2004).

Das Mammakarzinom ist darüber hinaus ein Tumor, der offenbar frühzeitig neoplastische Zellen in den Kreislauf schwemmt (Beitsch, 2000; Brandt, 1998; Racila, 1998). Diese können auch nach Tumoresektion zur Metastasenbildung führen. Die hämatogene Streuung von Tumorzellen mit anschließender Metastasenbildung bestimmen unter anderem die Prognose des Krankheitsverlaufes (Bae, 2000; Bischoff, 2003; Brandt, 1998; Braun, 2001a; Chambers, 2000; Gaforio, 2003; Graves, 1983; Kubens, 2002; Lalle, 2000; Pachmann, 2001; Pantel, 2003; Taubert, 2004; Terstappen, 2000; Zach, 2002).

Seit langem ist bekannt, dass Tumorzellen im Blut zirkulieren können. Die ersten Zellen wurden bereits 1869 von Ashworth (Asworth, 1869) in Blutaussstrichen nachgewiesen.

Nicht nur bei Brustkrebspatientinnen, sondern zum Beispiel auch bei kolorektalen Karzinomen (Castells, 1998; Guadagni, 2001) und dem Prostatakarzinom (Morgan, 2007), sind diese zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut nachgewiesen worden (Engell, 1955).

Der Nachweis dieser Zellen wurde von verschiedenen Forschungsgruppen für Patientinnen mit primärem Brustkrebs (Janni, 2005a; Mansi, 1999; Solomayer, 2001) und bereits metastasierten Brustkrebs (Cristofanilli, 2004; Hayes, 2006) erbracht. Auch das Knochenmark wurde bei Brustkrebspatientinnen auf Tumorzellen (Braun, 2005a) untersucht. Dabei wurde von einigen Studiengruppen festgestellt, dass Patientinnen mit Tumorzellen im Knochenmark eine ungünstigere Prognose hinsichtlich des Krankheitsverlaufes aufweisen (Diel, 1992; Diel, 1996; Janni, 2005a). Doch hier gilt einschränkend, dass nur bei ca. 40 Prozent der Patientinnen mit primärem Brustkrebs, die ein Rezidiv erlitten haben (Janni, 2005a), isolierte Tumorzellen im Knochenmark zu finden waren und dass es eine erhebliche Anzahl von Patientinnen gibt, die disseminierte Tumorzellen in ihrem Knochenmark aufweisen, aber nicht rezidivieren (Braun, 2005a). Das sind unter anderem Gründe dafür, dass die Frage, ob diese Zellen als unabhängiger Prognosefaktor gewertet werden können, kontrovers diskutiert wird.

Dass zumindest ein Teil der im Blut zirkulierenden Zellen maligne sind, wurde bereits von verschiedenen Forschungsgruppen nachgewiesen (Cristofanilli, 2005a; Fehm, 2002; Terstappen, 2000). In tierexperimentellen Studien konnten zwar durch Injektion von Tumorzellen Metastasen induziert werden, doch nur ein kleiner Anteil der Tumorzellen war dazu in der Lage (Al-Haji, 2003; Chambers, 2000). Der zeitliche Zusammenhang zwischen Zelldissemination und Metastasenbildung ist noch nicht eindeutig bekannt. Man nimmt an, dass sich die Zellen über längere Zeit in einem „schlafähnlichen“ Zustand befinden (Al-Haji, 2003). Das bedeutet, dass manche der zirkulierenden epithelialen Tumorzellen klinisch signifikant sind, während andere biologisch irrelevant sind. Sie unterscheiden sich also in ihrem proliferativen und metastatischen Potential (Müller, 2005).

Mit den bisherigen Bestimmungsmethoden für Tumorzellen im Blut und im Knochenmark, kann für die individuelle Patientin nicht festgestellt werden, ob die chemotherapeutische Behandlung Erfolg hatte oder nicht (Janni, 2005b).

Gibt es Möglichkeiten zu bestimmen, ob die adjuvante Chemotherapie bei einer einzelnen Patientin anschlägt oder nicht? Kann eine individuelle Vorhersage über das Outcome einer Patientin getroffen werden?

Ein Beitrag zur Klärung dieser Fragen wird mit der vorliegenden Arbeit geleistet.

In einer vorangegangenen Studie konnte bereits gezeigt werden, dass das Verhalten der entdeckten Tumorzellen die Antwort eines Primärtumors auf die neoadjuvante Therapie widerspiegelt (Pachmann, 2005a).

Wie auch in dieser Studie wurde bei der jetzigen Studie zur quantitativen Analyse epithelialer Tumorzellen die Laser Scanning Microfluorimetry (Pachmann, 2001) nach der MAINTRAC® Methode verwendet. Diese Methode erzielt höhere und verlässlichere Zellzahlen (Pachmann, 2005b) für wiederholte Real-Time Analysen von zirkulierenden epithelialen Tumorzellen bei nicht-metastasierten Brustkrebspatientinnen als andere Methoden.

Es wurden Messungen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, nach jedem Chemotherapiezyklus und am Ende der Therapie durchgeführt. Dabei wurde das Verhalten der Zellzahl auf die adjuvante Chemotherapie beobachtet und nach einem Zusammenhang zum Rezidivauftreten gesucht.

Es besteht Einigkeit darüber, dass metastasierter Brustkrebs nicht mehr heilbar ist (Cristofanilli, 2005a) und die Behandlung palliativ bleibt (Zielinski, 2005). Somit muss es ein vordergründiges Ziel für die nachfolgenden Studien sein, die Krankheit vor Entstehung der Metastasen zu behandeln und zu klären, welche Chemotherapie für welche Patientin das Überleben verbessert und ob zirkulierende epitheliale Tumorzellen im peripheren Blut uns dabei helfen können, die richtige Therapie einzusetzen.

5 Thesen der Dissertation

→ Das Verhalten der Tumorzellzahl im peripheren Blut bei Mammakarzinom-Patientinnen ist ein Hinweis auf das Ansprechen der adjuvanten Chemotherapie und korreliert mit dem rezidivfreien Überleben.

→ Anhand eines Anstieges der Tumorzellen im peripheren Blut kann eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Tumorrezidivs getroffen werden.

→ Tumorzellen im peripheren Blut können als unabhängiger Prognosefaktor gewertet werden.

6 Zielstellung und Aufgabenpakete

- Ziel der Dissertation:

→ Das Ziel der Dissertation ist es, den Nachweis zu liefern, dass die quantitative Analyse von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut eine individuelle Aussage über das Ansprechen des Tumors einer Patientin auf die Chemotherapie treffen und das Auftreten eines Rezidivs vorhersagen können.

→ Weiterhin ist die Studie dazu angelegt, einen Nachweis für die Korrelation des Zellzahlverhaltens unter der adjuvanten Chemotherapie zum rezidivfreien Überleben zu erbringen.

- Aufgaben der Dissertation:

→ Zu den Aufgaben der Dissertation zählte die Verarbeitung der Blutproben mit anschließender Messung der Tumorzellzahl im Blut der Patientinnen sowie das Zusammentragen der Daten von Tumorstadium, Therapieplan und Krankheitsverlauf der Patientinnen im Sinne des Datenschutzgesetzes und mit Einwilligung der Patientinnen.

7 Methodik

7.1 Patientenauswahl

Aus der Klinik für Gynäkologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena wurde bei 91 Patientinnen mit zur Erstdiagnose nicht metastasierten primärem Brustkrebs im Zeitraum von Januar 2002 bis Dezember 2005 das periphere Blut auf zirkulierende Tumorzellen in einer randomisierten Studie prospektiv untersucht.

Die Zellen wurden jeweils bei der Erstdiagnose, vor Beginn der Therapie, vor jedem Zyklus und nach Beendigung der Chemotherapie gemessen und ausgewertet.

Alle Patientinnen erhielten adjuvante Chemotherapie. Die Therapien basierten je nach dem Tumorstadium auf der anthrazyklinhaltigen Kombinationstherapie von 5-Fluorouracil, Epirubicin und Cyclophosphamid mit oder ohne folgende Gabe von Taxanen oder der anthrazyklinfreien Kombinationstherapie von Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluorouracil sowie für ältere Patientinnen Capecitabine. Je nach Her2/neu Status wurden die Patientinnen ebenfalls mit Herceptin behandelt.

Die einzelnen Chemotherapeutika und Therapieschemata sind in Kapitel 7.2 aufgelistet.

7.2 Therapie

7.2.1 Adjuvante Chemotherapie

Unter adjuvanter Chemotherapie versteht man die Gabe einer Kombination mehrerer chemotherapeutischer Substanzen nach Tumorexzision zur Bekämpfung verbliebener Tumorstellen und zur Verhinderung der Rezidiventstehung. Zur Anwendung stehen verschiedene Chemotherapeutika und Kombinationen derselben zur Verfügung. Vor der Behandlung müssen mögliche Begleiterkrankungen der Patientinnen abgeklärt sein, um die Folgen der teilweise schweren Nebenwirkungen zu verringern.

7.2.2 Chemotherapeutika

Epirubicin (E) ist ein Anthrazyklin und stört somit den Aufbau von DNA, RNA und schädigt gleichzeitig die Zellwand.

Cyclophosphamid (C) ist eine alkalysierende Substanz, welche sich intrazellulär mit der DNA verbindet und somit die Zellteilung hemmt.

5-Fluorouracil (F) wird anstelle von Thymin und Cytosin in die DNA eingebaut, die daraufhin funktionsuntüchtig ist.

Methotrexat (M) wird in situ anstelle von Folsäure in den Stoffwechsel der Zelle eingebaut und hemmt auf diese Weise Enzyme, die für den Aufbau und Reparatur der DNA verantwortlich sind.

Taxane stören den Abbau von Mikrotubuli, die Bestandteil der Mitosespindeln sind. Somit wird die Mitose gehemmt.

Capecitabine wird im Körper zu 5-Fluorouracil umgewandelt und kann in Tablettenform verabreicht werden.

Herceptin ist ein monoklonaler Antikörper, der an Brustkrebszellen mit dem Her2/neu Rezeptor bindet und somit das Wachstum hemmt. Es wird bei nur bei Patientinnen verabreicht, die einen hohen Anteil an Her2/neu Rezeptoren besitzen.

7.2.3 Chemotherapieschemata

Die adjuvante Chemotherapie beim Mammakarzinom wird unterteilt in anthrazyklinhaltige und anthrazyklinfreie Kombinationstherapie. Zusätzlich werden Taxane bei hohem Erkrankungsrisiko verabreicht.

1. Anthrazyklinhaltige Chemotherapie:

FEC {FAC}– F (500mg/m² KO i.v.); E{A} (100{60}mg/m² KO i.v.), C (500mg/m² KO i.v.), 6 Zyklen alle 21 Tage, jeweils am 1. Tag

EC {AC}– E{A} (90{60}mg/m² KO i.v.), C (600mg/m² KO i.v.), 4-6Zyklen alle 21 Tage, jeweils am 1. Tag

2. Anthrazyklin- und taxanhaltige Chemotherapie

TAC – T (75mg/m² KO i.v.); A (50mg/m² KO i.v.), C (500mg/m² KO i.v.), 6 Zyklen alle 21 Tage

FEC -> D - F (500mg/m² KO i.v.); E (100mg/m² KO i.v.), C (500mg/m² KO i.v.), D (100mg/m² KO i.v.) 3 Zyklen FEC q21, danach 3 Zyklen Docetaxel q21

EC (AC) -> P (D) - E{A} (90{60}mg/m² KO i.v.), C (600mg/m² KO i.v.), P {D} (175 {100} mg/m² KO i.v.), 4Zyklen EC {AC} q21, danach 4 Zyklen P {D} q21

3. Anthrazyklinfreie Chemotherapie

CMF – C (500mg/m² KO i.v.); M (40mg/m² KO i.v.), F (600mg/m² KO i.v.), 6 Zyklen alle 28 Tage, jeweils am 1. und 8. Tag

TC – T (75mg/m²KO i.v.); C (600mg/m² KO i.v.)4 Zyklen alle 3 Wochen, q21

4. Sonstige Zytostatika

Capecitabine – über 14 Tage 2x täglich 1250mg/m² KO p.o., danach 7 Tage Pause

Herceptin – Initialdosis bei metastasierten Mamma-Ca 4mg/kg Körpergewicht, dann wöchentliche Erhaltungsdosis von 2mg/kg Körpergewicht

7.3 Materialien und Geräte

7.3.1 Gerät

Laser Scanning Cytometer® (Compucyte Corporation, Cambridge, MA, USA)

7.3.2 Antikörper & Chemikalien

HEA-FITC (HEA, Miltenyi Bergisch Gladbach, Germany) erkennt ein Epitop auf epithelialen Zellen einschließlich Tumorzellen

CD45-PE (Miltenyi Bergisch Gladbach, Germany) ist ein Panleukozytenmarker

FcR Blocking Reagent (Miltenyi Bergisch Gladbach, Germany) blockiert Fc Rezeptor exprimierende Zellen, z.B. Makrophagen und Monozyten

7.4 Methode

7.4.1 Probengewinnung

In Zusammenarbeit mit der Klinik für Frauenheilkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena werden den Brustkrebspatientinnen mit ihrem Einverständnis im Rahmen der konventionellen Blutbildkontrolle zur Überprüfung des Krankheitsverlaufes zusätzlich eine Monovette EDTA-Blut mittels peripher venöser Punktion entnommen und in das Onkologische Labor zur weiteren Verarbeitung gesendet. Diese Methode vereinigt mehrere Vorteile, unter anderem die geringe Belastung und die wenigen Risiken einer Blutentnahme für die Patientinnen im Gegensatz zu denen einer invasiven Knochenmarkspunktion.

7.4.2 Blutaufbereitung (MAINTRAC®)

Nach höchsten 3 Tagen Lagerung der Blutproben ist der erste Schritt der Aufbereitung die Erythrozytenlyse.

Dafür wird 1ml Blut auf 9ml Erythrozytenlysepuffer gegeben und 10min bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend werden die Proben für 10min mit 1200U/min bei 14°C zentrifugiert und deren Überstände verworfen.

Der zweite Schritt besteht in der Antikörperzugabe.

Das Pellet wird in 500µl PE-Puffer resuspendiert und zu den gesamten weißen Blutzellen werden 30,0µl FcR-Blockingreagenz, 12,5µl HEA-FITC und 2,5µl CD 45-PE zur Inkubation hinzugefügt. HEA-FITC ist ein von Mäusen gewonnener und mit Fluorochrom gekoppelter Antikörper gegen Humanes Epitheliales Antigen und bindet den CD326 Rezeptor, der von Epithelialzellen einschließlich Karzinomzellen exprimiert wird und an der Zelladhäsion beteiligt ist. CD45-PE bindet CD45, einen Rezeptor, der auf nahezu allen Zellen hämatopoetischen Ursprungs, ausgenommen Erythrozyten, exprimiert wird. Somit können Leukozyten von nicht-hämatopoetischen Zellen unterschieden werden. Beide Antikörper sind an einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt und können mittels Fluoreszenz ausgewertet werden. Nach kurzem Schwenken und einer Inkubationszeit von 15min im Kühlschrank werden die Proben mit 455µl PE-Puffer aufgefüllt und stehen zur Messung mit dem LSC bereit.

7.4.3 Laser Scanning Cytometer®

Im Anschluss an die Blutaufbereitung erfolgt die Messung und Auswertung der Proben. Zurzeit steht dem Onkologischen Labor ein Laser Scanning Cytometer® zur Verfügung.

Dazu trägt man 20µl der Zellsuspension auf einen Objektträger auf, der auf dem motorgetriebenen Scanning Mikroskoptisch platziert wird. Das Objektiv mit zwanzigfacher Vergrößerung wird manuell auf eine scharfe Abbildung eingestellt. Der Laser belichtet die Probe nach einem bestimmten Muster, die Detektionseinheit erfasst die spezifischen Signale und eine Auswerteroutine ordnet sie Leukozyten (rot), epithelialen Zellen (grün) und Artefakten zu und zählt diese.

Abbildung 1 zeigt einen Ausschnitt der Probe auf dem Objektträger. Die rot fluoreszierenden Zellen mit CD45 sind gut von den grün fluoreszierenden epithelialen Zellen abzugrenzen.

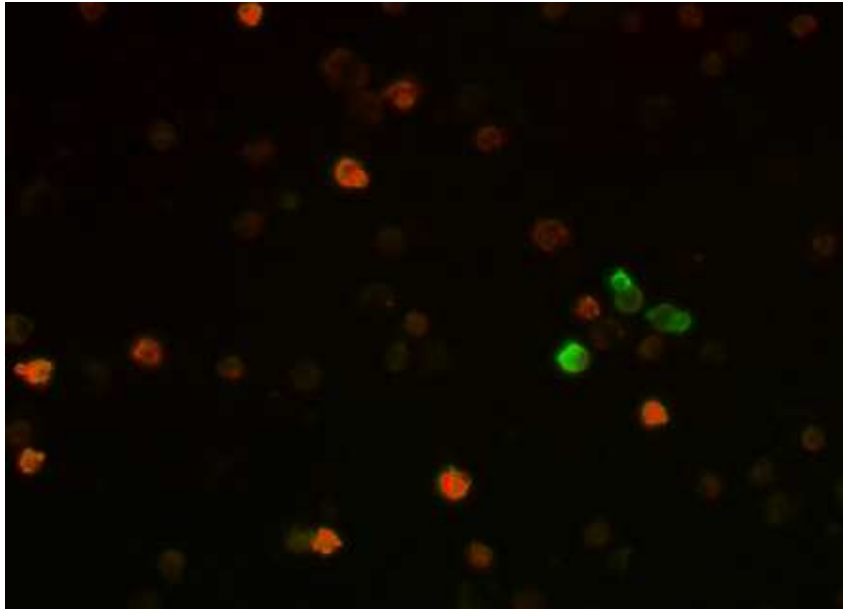


Abbildung 1: Leukozyten und Epithelialzellen in 20xfacher Vergrößerung

In Abbildung 2 sind die Epithelialzellen noch einmal in höherer Vergrößerung dargestellt. In dieser Weise werden die Zellen gesichtet und entschieden, ob es sich um Tumorzellen oder Artefakte handelt. In dieser Abbildung handelt es sich um Epithelialzellen, welche an den grün fluoreszierenden Caps erkennbar sind.

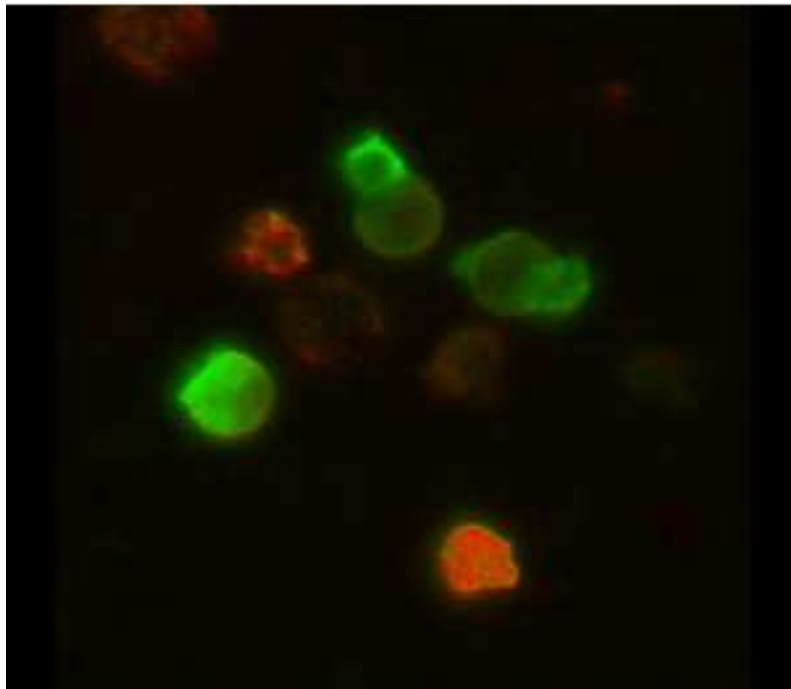


Abbildung 2: Artefakte, Leukozyten und Epithelialzellen in 40xfacher Vergrößerung

Die jeweilige Position der Epithelialzellen auf dem Objektträger wird gespeichert, um sie nach der Messung automatisch anzufahren und durch geschulte Mitarbeiter mit vierzigfacher Vergrößerung visuell zu überprüfen. Diese Daten werden für jede einzelne Probe gespeichert und können zu jeder Zeit abgerufen und kontrolliert werden. Durch die visuelle Kontrolle wird gewährleistet, dass bei der anschließenden Berechnung die mögliche Verfälschung der Werte durch Artefakte und Nicht-Tumorzellen gering gehalten wird. Anhand der ausgezählten wirklichen Tumorzellen errechnet man die Zellzahl auf 1ml EDTA-Blut und auf ein Körperblutvolumen von 5000ml.

7.4.4 Statistik

Für sämtliche Analysen wurde die Kaplan-Meyer-Überlebenskurve verwendet. Der Einfluss verschiedener prognostischer Faktoren in der rezidivfreien Überlebenszeit wurde unter der Nullhypothese, dass der Faktor keinen Einfluss besitzen würde, mit univariater Analyse mittels des Log- Rank Tests geprüft. Des Weiteren wurde das Cox Regressionsmodell verwendet, um den Einfluss der peripher zirkulierenden epithelialen Tumorzellen darzustellen und die dazugehörige Hazard Ratio zu ermitteln. Für das lineare Cox Regressionsmodell wurde der Quotient zwischen dem höchsten Betrag (Abnahme) oder zwischen den Tiefstpunkt und dem Betrag am Ende der Therapie (Anstieg) berechnet. Außerdem wurde die Cox Regression mit einem rückwärtsgerichteten Auswahlverfahren für die Wahrscheinlichkeitsrate verwendet, um die Auswirkungen von zirkulierenden Tumorzellen, Tumorgröße, Lymphknotenstatus und Östrogenrezeptorstatus zu untersuchen. Alle Analysen wurden mit dem statistischen Programm SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) durchgeführt.

8 Ergebnisse

8.1 Patientendaten

Die Tabelle 13 zeigt die demografischen Daten der Patientinnen in Absolut- und Prozentwerten.

Das Durchschnittsalter der 91 ausnahmslos weiblichen Patientinnen lag bei 55 Jahren.

Die Klassifizierung des Tumorstadiums erfolgte nach TNM, wobei 53 Patientinnen T1, 30 T2 und jeweils 4 Patientinnen T3 und T4 zugeordnet wurden. Nach Operation mit Lymphknotenexzision stellte man bei 46 Patientinnen den Lymphknotenstatus N0, bei 36 N1, bei 5 N2, bei 3 N3 und bei einer Patientin Nx (unbekannt) fest.

Östrogenrezeptorstatus positiv waren 60,4 % der Patientinnen.

20 von 91 Patientinnen rezidierten in dem Beobachtungszeitraum bis Dezember 2005, wobei das rezidivfreie Überleben, gerechnet vom Zeitpunkt der Erstdiagnose bis zum Zeitpunkt der Feststellung eines Rezidivs, im Mittel bei 386 Tagen lag. Die kürzeste rezidivfreie Zeit nach Beendigung der Chemotherapie lag bei 71 und die längste bei 833 Tagen.

8.2 Auswertung

8.2.1 Tumorzellzahlverhalten

Die Messungen wurden wie in Kapitel 7.1 erläutert zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt.

Bei der Auswertung sind in Bezug auf das Verhalten der Tumorzellen im peripheren Blut drei Gruppen unterschieden worden, wobei das Verhalten der Zellen am Ende der Chemotherapie bzw. des Beobachtungszeitraumes für die Unterscheidung ausschlaggebend ist.

Die folgenden drei Abbildungen zeigen die Höhe der Tumorzellzahl in einem Milliliter des peripheren Blutes in Bezug auf den Beobachtungszeitraum in Tagen. Dabei entspricht der Tag 0 dem Tag der Erstdiagnose und somit der ersten Messung. Die letzte Zellzahl bezieht sich auf das Ende des Beobachtungszeitraumes bzw. das Ende der Chemotherapie.

Die Abbildung 3 (Gruppe 1 mit insgesamt 28 Patientinnen) zeigt drei Patientinnenbeispiele, bei denen zur Erstdiagnose eine hohe Zahl an zirkulierenden Tumorzellen gemessen wurde, die unter der Chemotherapie bei einer Patientin um mehr als das 10fache des Ausgangswertes sank und bei 2 Patientinnen um das 1000fache, bei denen anschließend keine Tumorzellen mehr nachweisbar waren.

In der Abbildung 4 (Gruppe 2 mit insgesamt 30 Patientinnen) sind drei typische Verläufe von Patientinnen dargestellt, bei denen sich die Zellzahl während der Behandlung kaum wesentlich veränderte (um weniger als das 10fache).

Die dritte Gruppe bestand aus insgesamt 33 Patientinnen, bei denen die Zellzahl vom ersten Wert oder nach einer initialen Reduktion bis zur Beendigung der Therapie ausgehend vom niedrigsten Wert um das 10fache angestiegen ist. Beispiele von drei solchen Patientinnen dazu sind in Abbildung 5 dargestellt. Bei einer Patientin (grüne Kurve) fiel die Zellzahl unter Chemotherapie überhaupt nicht ab. Die türkisfarbene Kurve zeigt eine Patientin, bei der während der Chemotherapie die Zellen bis unter die Nachweisgrenze sanken, aber zwischen den einzelnen Zyklen wieder stark anstiegen. Am Ende der Therapie stieg die Zellzahl stetig an. Die blaue Kurve zeigt einen ähnlichen Verlauf, nur dass die Zellzahl nicht so stark abfiel, sondern zum Ende des Beobachtungszeitraumes stetig anstieg.

1. Abfall der Tumorzellzahl größer als das 10fache des Ausgangswertes (siehe Abbildung 3)

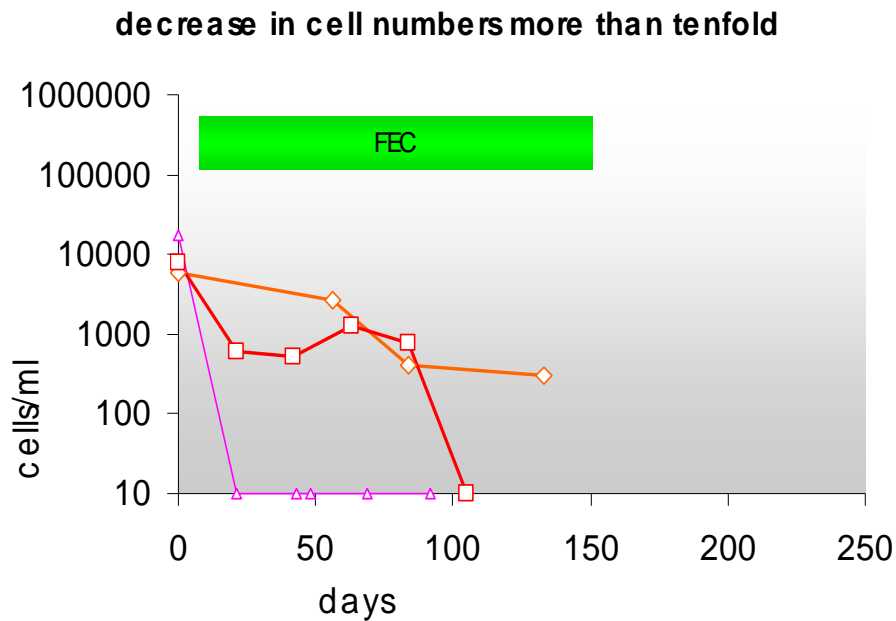


Abbildung 3: Abfall der Zellzahl > 10fache

2. minimale Veränderung der Tumorzellzahl kleiner als das 10fache (siehe Abbildung 4)

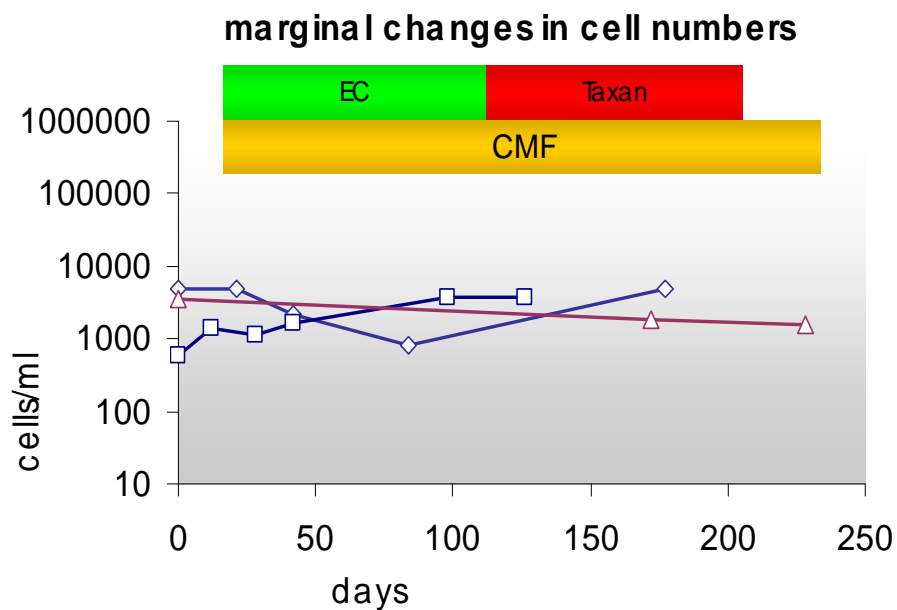


Abbildung 4: Geringe Veränderung der Zellzahl

3. Anstieg der Tumorzellzahl größer als das 10fache oder initial Abfall der Zellen und anschließendem Anstieg um mehr als das 10fache (siehe Abbildung 5)

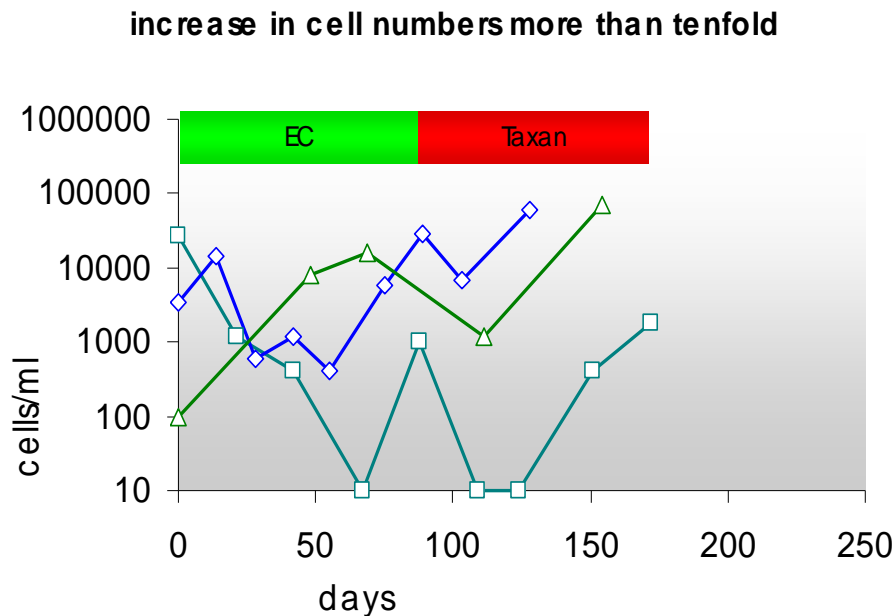


Abbildung 5: Anstieg der Zellzahl > 10fache

8.2.2 Rezidivrate in Bezug zum Tumorstadium und Prognosefaktor

Es ist bekannt, dass das Risiko ein Rezidiv zu erleiden mit der Größe und Ausbreitung des Primärtumors und der Anzahl der ungünstigen Prognosefaktoren steigt.

In der Tabelle 2 auf Seite 17 wird der Zusammenhang zwischen dem Tumorstadium und dem Auftreten eines Rezidivs dargestellt.

Von 91 Patientinnen blieben im Beobachtungszeitraum 71 in kompletter Remission und bei 20 Patientinnen wurde ein Rezidiv festgestellt. Es ist aber nicht auszuschließen, dass einige Patientinnen, die bisher in kompletter Remission sind, in Zukunft noch ein Rezidiv erleiden werden.

In der Gruppe der Patientinnen in kompletter Remission wiesen 41% einen positiven Nodalstatus zur Erstdiagnose auf. 82% dieser Patientinnen befanden sich im Tumorstadium T1 und T2.

In der Gruppe der Patientinnen mit Rezidiv hatten 70% einen positiven Lymphknotenbefall und 63% wurden dem Tumorstadium T3 und T4 zugeordnet.

Tabelle 2: Rezidivrate in Bezug zum Tumorstadium

	Total	Komplette Remission	Rezidiv
Anzahl der Patientinnen	91	71	20
Durchschnittsalter	55	55	55
ER pos. in %	55 = 60%	43 = 61%	12 = 60%
ER neg. in %	36 = 40%	28 = 39%	8 = 40%
N pos. in %	43 = 47%	29 = 41%	14 = 70%
N neg. in %	48 = 53%	42 = 59%	6 = 30%
T1 und T2	83	68 = 82%	15 = 18%
T3 und T4	8	3 = 37%	5 = 63%

8.2.3 Tumorzellzahlverhalten in Bezug zur Rezidivrate

Bei den Messungen konnte gezeigt werden, dass im peripheren Blut ausnahmslos bei allen Patientinnen zirkulierende Tumorzellen vorhanden waren.

Zum Ende der Therapie bzw. des Beobachtungszeitraum (siehe Tabelle 3) wiesen von 91 Patientinnen 28 einen Abfall der Zellzahl um mehr als das 10fache des Ausgangswertes auf, von denen nur eine Patientin rezidierte. In der Gruppe der Patientinnen, bei denen sich die Zellzahl nicht nennenswert änderte, rezidierten 5 von 30 Probandinnen.

Die höchste prozentuale Rezidivquote mit 42% (14 von 33 Patientinnen) ergab sich bei den Patientinnen, bei denen die Tumorzellen im Blut um mehr als das 10fache zum Ende der Therapie hin anstiegen, selbst wenn einige Patientinnen aus dieser Gruppe unter der Chemotherapie zuerst mit der Zellzahl abfielen, um dann wieder um das 10fache anzusteigen (siehe Abbildung 5).

Tabelle 3: Zusammenhang des Tumorzellzahlverhaltens mit der Entstehung eines Rezidivs am Ende der Therapie

Tumorzellzahl	Total	Pat. in komplett. Remission	Pat. mit Rezidiv
	91	71	20
Abfall > 10fach	28 = 31%	27 = 38%	1 = 5%
Minimale Veränderung < 10fach	30 = 33%	25 = 35%	5 = 25%
Anstieg > 10fach	33 = 36%	19 = 27%	14 = 70%

Die Abbildung 6 zeigt das rezidivfreie Überleben der 3 Gruppen kumulativ in einer Kaplan-Meyer-Kurve.

Die grüne Kurve stellt Gruppe 1 (Abfall größer als das 10fache), die blaue Kurve Gruppe 2 (Veränderung kleiner als das 10fache) und die rote Kurve Gruppe 3 (Anstieg größer 10fache oder initial Abfall und später Anstieg größer 10fache) dar.

Anhand dieser Kurve kann gezeigt werden, dass der Zusammenhang zwischen Anstieg der peripher zirkulierenden epithelialen Tumorzellen unter der adjuvanten Chemotherapie und der Entstehung eines Rezidivs signifikant ($p < 0,001$ siehe Tabelle 4) ist.

Das Verhalten der peripher zirkulierenden Tumorzellen (Anstieg) kennzeichnet die Patientinnen mit hohem Risiko für die Entstehung eines Rezidivs gegenüber jenen, die bisher keine Anzeichen lokaler Rezidive oder Metastasen aufweisen.

Außerdem lässt sich vermuten, dass die Patientinnen der Gruppe 2 nur gering oder gar nicht auf die Chemotherapie ansprechen.

Die Tabellen 5, 6 und 7 stellen die Anzahl der rezidierten Patientinnen zu verschiedenen Zeitpunkten dar, wobei der erste Wert zum Zeitpunkt

Null, der Beginn der Messungen und die letzten Zahlen das Ende des Beobachtungszeitraumes sind.

Tabelle 5 zeigt die Anzahl der rezidierten und rezidivfreien Patientinnen der Gruppe 3 (Anstieg der Zellzahl größer als das 10fache) zu verschiedenen Zeitpunkten des Beobachtungszeitraumes. Am Ende des Beobachtungszeitraumes Dezember 2005 sind 14 von 33 Patientinnen rezidiert.

Bei der Gruppe 2 (kaum Veränderung der Zellanzahl) sind am Ende der Beobachtung 5 von 25 (siehe Tabelle 6) und bei Gruppe 1 (Zellabfall größer als das 10fache) eine von 28 Patientinnen (siehe Tabelle 7) rezidiert.

Berechnungen der Hazard-Ratio ergaben, dass Patientinnen mit Anstieg der Tumorzellen ein elffach höheres Risiko haben, an einem Rezidiv zu erkranken als Patientinnen mit Zellabfall (siehe Exp. (B) in Tabelle 8). Patientinnen bei denen sich die Zellzahl nicht wesentlich änderte haben ein dreifach höheres Risiko eines Rezidivs.

Nicht alle Patientinnen mit einem Zellanstieg haben bis jetzt ein Rezidiv erlitten, da der Beobachtungszeitraum für einen Teil von ihnen möglicherweise zu kurz war.

Es ist davon auszugehen, dass die Signifikanz mit Länge des Beobachtungszeitraumes zunehmen wird.

Tabelle 4: Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Gruppen von Anstieg

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	13,686	2	0,001

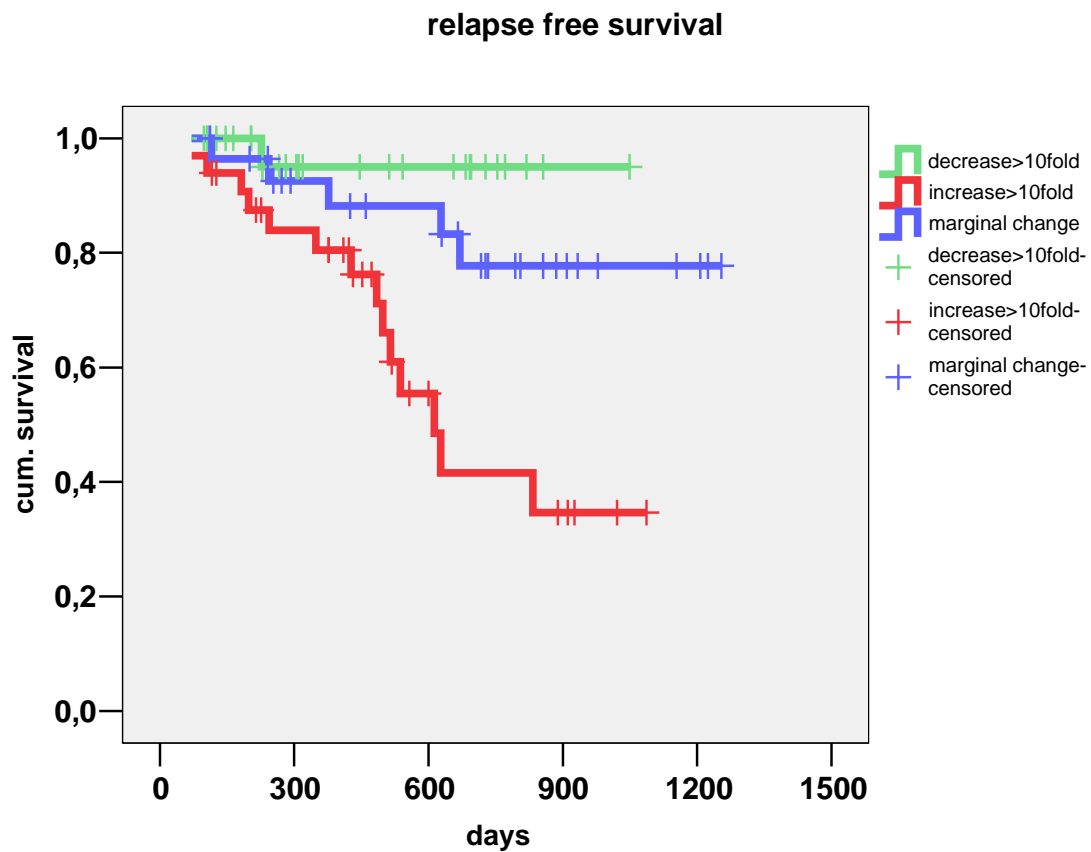


Abbildung 6: Kaplan-Meyer-Kurve des rezidivfreien Überlebens in Bezug zum Verhalten der Tumorzellzahl

Tabelle 5: Rezidivrate bei Patientinnen mit Zellanstieg

Pat. mit Risiko	33	28	22	19	19
Rezidiv	0	5	11	14	14

Tabelle 6: Rezidivrate bei Patientinnen ohne wesentliche Zellzahlveränderung

Pat. mit Risiko	30	28	27	25	25
Rezidive	0	2	3	5	5

Tabelle 7: Rezidivrate bei Patientinnen mit Zellabfall

Pat. mit Risiko	28	27	27	28	28
Rezidive	0	1	1	1	1

Tabelle 8: Höhe des Risikos zur Entstehung eines Rezidivs

		B	SE	Wald	df	Signifi- kantz	Exp (B)	95,0% Konfidenzinter- v. für Exp(B)	
								Untere	Obere
Schritt 1	Zellen (Abfall)			9,301	2	0,010			
	Zellen1 (gleichbl.)	1,317	1,082	1,481	1	0,224	3,732	0,447	31,14
	Zellen2 (Anstieg)	2,442	1,038	5,532	1	0,019	11,49	1,502	87,91

In der Abbildung 7 ist der Bezug zwischen der rezidivfreien Überlebenszeit zum Tumorstadium in der Kaplan-Meyer-Kurve dargestellt.

Es wird zwischen Tumorstadium T1 als erste Gruppe (blau) und den Größen T2-T4 als zweite Gruppe (grün) unterschieden. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Kurven. Die Patientinnen mit T1-Stadium rezidivieren jedoch später.

Man könnte also vermuten, dass das Tumorstadium allein keinen Aufschluss über das Risiko für die Entstehung eines Rezidivs geben kann.

In der Tabelle 9 ist die Signifikanz zwischen diesen beiden Gruppen aufgeführt.

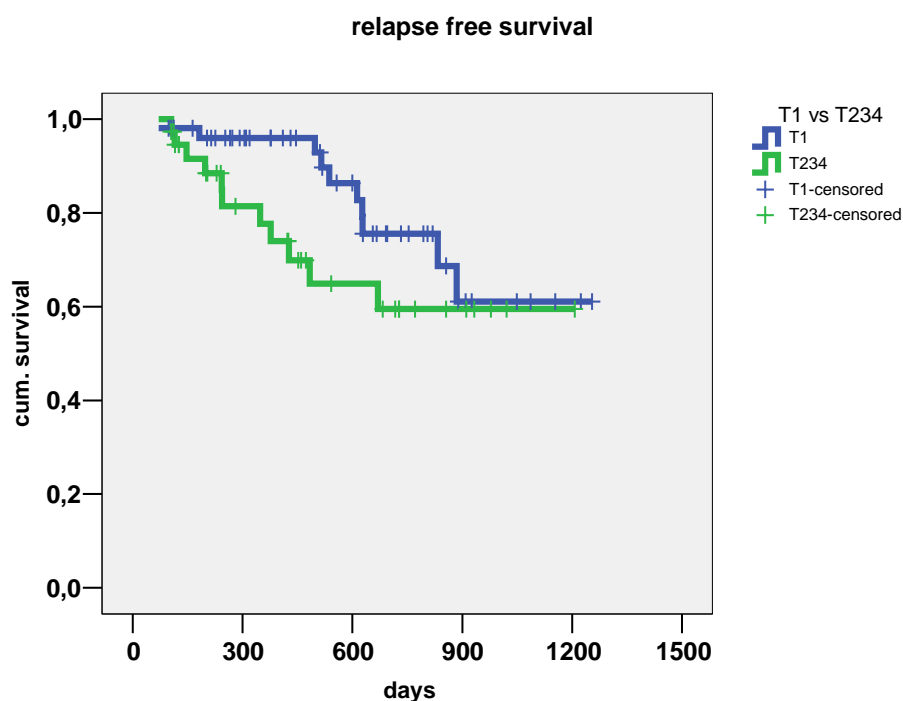


Abbildung 7: Kaplan-Meyer-Kurve rezidivfreies Überleben T1 versus. T2,3,4

Tabelle 9: Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von T1 versus T2,3,4

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Signifikanz
Log Rank (Mantel-Cox)	2,307	1	0,129

Anders verhält es sich beim rezidivfreien Überleben in Bezug zum Nodalstatus. Die Abbildung 8 zeigt, dass es einen signifikanten Unterschied im rezidivfreien Überleben zwischen Patientinnen mit negativen und Patientinnen mit positiven Lymphknotenstatus gibt.

Patientinnen bei denen die Lymphknoten nicht frei von Tumorzellen sind, rezidivieren häufiger und früher.

Die Signifikanz liegt bei 0,028.

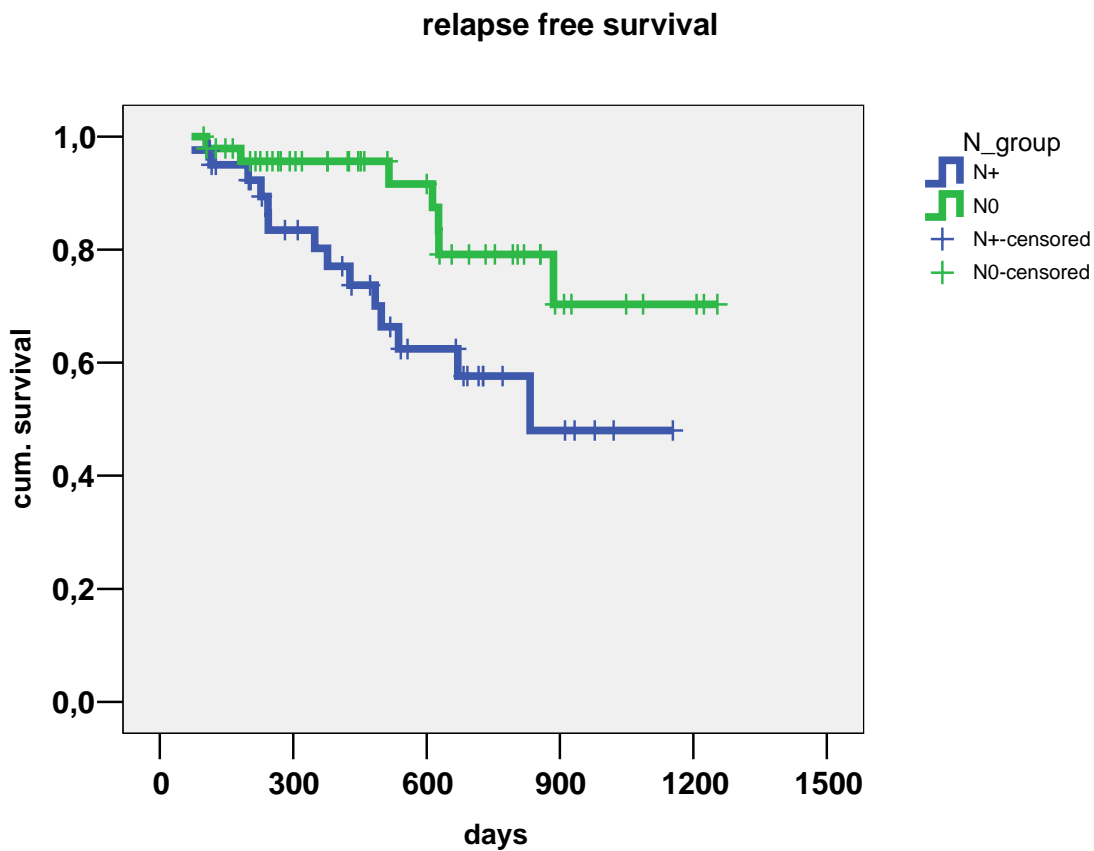


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve rezidivfreies Überleben N+ versus N0

Es wird angenommen, dass Östrogenrezeptor-negative Patientinnen eine schlechtere Prognose in Bezug auf das rezidivfreie Überleben als Östrogenrezeptor-positive Patientinnen. Deshalb wurden Patientinnen anhand ihres Östrogenrezeptorstatus in Bezug auf die rezidivfreie Überlebenszeit verglichen. In der Kaplan-Meyer-Kurve (Abbildung 9) ist zu erkennen, dass kein signifikanter Unterschied (Signifikanz 0,802) zwischen Östrogenrezeptorstatus negativ (blaue Kurve) und Östrogenrezeptorstatus positiv (grün) besteht.

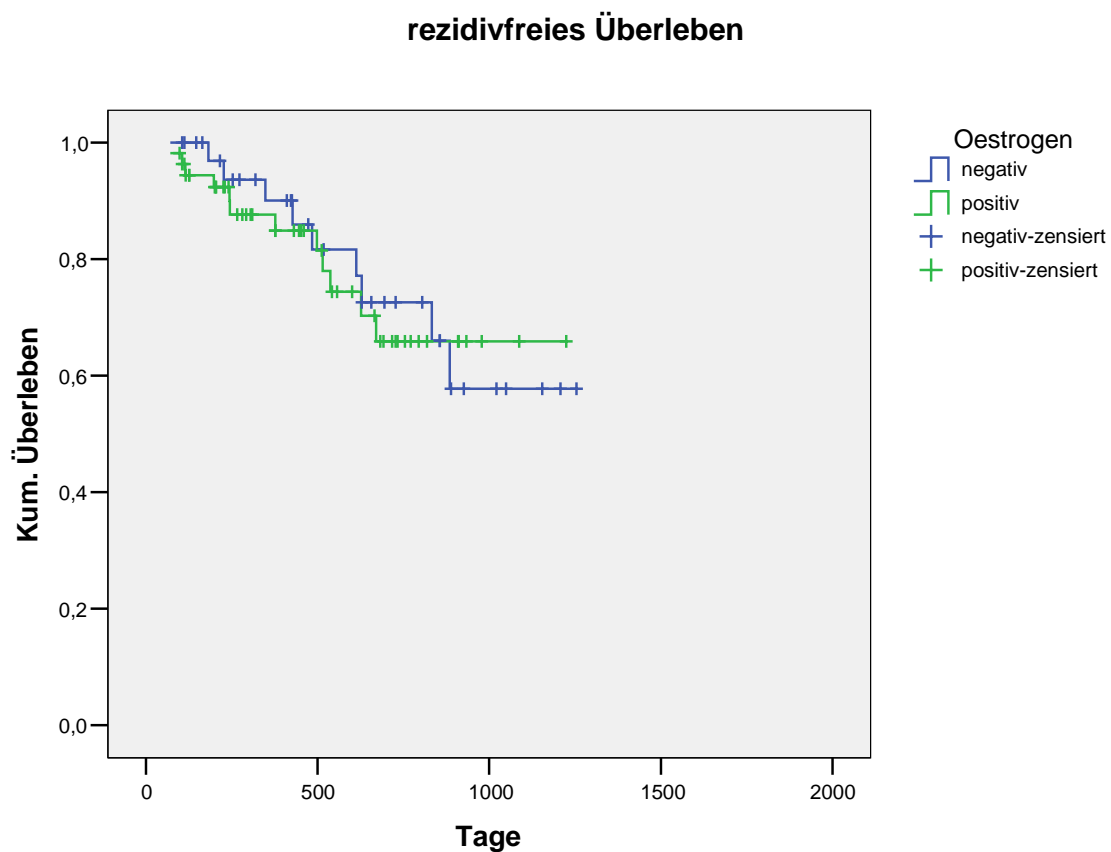


Abbildung 9: Kaplan-Meyer-Kurve der rezidivfreien Überlebenszeit Östrogenrezeptor positiv versus Östrogenrezeptor negativ

9 Diskussion

Ein Tumor ist eine Gewebsmasse, die durch abnorme Vermehrung körpereigener entarteter Zellen entsteht, deren Regulation von Zellteilung und Zellverlust gestört ist. Der Tumor gilt als maligne, wenn er dazu in der Lage ist, gesundes Gewebe zu infiltrieren und zu destruieren. Außerdem ist er in der Lage, seine Zellen in den Körper zu streuen, die sich dann in anderen Organen absiedeln und zur Bildung so genannter Metastasen führen können. Diese Streuung der Zellen kann auf dem Lymphweg entlang der Lymphbahnen, die an den Tumor grenzen, sowie hämatogen, das heißt über den Blutweg oder über Flüssigkeiten in Körperhöhlen geschehen. Das bedeutet, dass der Tumor auch in der Lage ist, Blutgefäße zu infiltrieren und von dort Zellen in den Organismus streuen kann. Das konnten pathologische Befunde zeigen, bei denen der Tumor Blutgefäße infiltriert hatte (erstmalig entdeckt 1862 von Hannover). Auch in Blutaussstrichen von Karzinompatienten wurden schon früh Tumorzellen nachgewiesen (Engell, 1955; Finkel, 1960).

Zusätzlich wird angenommen, dass nach der Operation ein kleiner Teil an Tumorzellen zurückbleibt beziehungsweise während der Operation durch Manipulation des Tumors durch den Operateur Tumorzellen in den Kreislauf ausgeschwemmt werden können (Choy, 1996; Denis, 1996; Hansen, 1995; Uchikura, 2002, Camara 2006). Dieser kleine, aber nicht unerhebliche Anteil an malignen Zellen kann dafür verantwortlich sein, dass auch nach Jahren Rezidive bei Patientinnen auftreten, die als N0/M0 eingestuft waren. Da die MAINTRAC® Methode einfach, schnell anwendbar und wenig invasiv und belastend für die Patientin ist, wurde in einer Studie den Patientinnen kurz vor und nach der Operation, so wie ein paar Tage danach Blutproben entnommen. Dabei stellte sich heraus, dass es bei der Mehrzahl der Patientinnen zu einem enormen Anstieg der zirkulierenden Tumorzellen 3-4 Tage nach der Operation kam (Camara, 2006).

Mit dem Ziel, Restzellen nach erfolgreicher Operation zu eliminieren und somit ein Rezidiv zu verhindern und die Heilung anzustreben, wurde die adjuvante Chemotherapie eingeführt. Sie ist heutzutage als Standardtherapie etabliert. Verschiedene Studien zeigten, dass sich die Gesamtüberlebenszeit und das rezidivfreie Überleben der Patientinnen,

die eine adjuvante Therapie erhalten hatten, signifikant gegenüber denen ohne Therapie verlängerte (Bonadonna, 2005; Earl, 2004; Lalle, 2000; Racila, 1998; Shimizu, 2002).

In der Mitte der 1970er Jahre war die Kombination bestehend aus einem alkylierenden Chemotherapeutikum, dem Cyclophosphamid und 2 Antimetaboliten, Methotrexate und Fluorouracil (CMF) zunächst Standard (Bonadonna, 1976). Cyclophosphamid vernetzt die DNA und verhindert somit die Zellteilung. Fluorouracil wird anstelle von Thymin und Cytosin in die DNA eingebaut und Methotrexat wird anstelle Folsäure eingebaut und beide verhindern somit die DNA-Replikation.

In den folgenden Jahren fanden dann auch die Anthrazykline ihre Anwendung in der Behandlung des Mammakarzinoms. Diese Medikamente interagieren direkt mit der DNA, verhindern die Tumorzellproliferation und Genexpression. Das erste Anthrazyklin war Doxorubicin. In Folgestudien wurden Kombinationen der Chemotherapeutika miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass weder die Kombination CMF noch die Kombination FAC bei Lymphknoten positiven Patientinnen im Gesamtüberleben und im rezidivfreien Überleben der anderen überlegen war. Bei Lymphknoten negativen Patientinnen zeigte sich allerdings eine signifikante Überlegenheit von FAC mit Verlängerung des rezidivfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens (Martin, 2003). Auch andere bestätigten die signifikante Verlängerung der anthrazyklin-basierten Chemotherapie gegenüber dem CMF-Schema in bezug auf das Gesamtüberleben und die rezidivfreie Überlebenszeit ((EBCTCG), 2005). Somit gilt heute die auf anthrazyklin-basierende Chemotherapie als Standard.

Da diese Medikamente starke Nebenwirkungen haben und nicht nur toxisch auf Tumorzellen sondern auch auf gesundes Gewebe wirken, ist es wichtig, kontrollieren zu können, ob die individuelle Patientin auf die Therapie anspricht. In 50 Prozent der diagnostizierten Brustkrebsfälle liegt das Alter der Patientinnen bei 65 Jahren oder darüber (Dellapasqua, 2007). Bei diesen Patientinnen kann zum Beispiel die Kardiotoxizität von Anthrazyklinen (Nq, 2007) aufgrund eventueller altersbedingter Vorerkrankungen eine Rolle spielen. Es muss daher abgewogen werden,

ob die einzelne Patientin einen Vorteil von der Chemotherapie hat oder nicht, um die dann schlimmeren Nebenwirkungen zu vermeiden. Man darf trotzdem nicht vergessen, dass diese Patientinnen trotz ihres Alters eine Verlängerung der rezidivfreien Überlebenszeit und des Gesamtüberlebens durch adjuvante Therapie haben und oft sogar von der Dosierung aufgrund ihres Alters zu niedrig behandelt werden (Dellapasqua, 2007).

Aber wie kann entschieden werden, welche Patientin profitiert und welche nicht? Bisher konnte mit keiner Messmethode für die individuelle Patientin nachgewiesen werden, ob sie in der rezidivfreien Zeit einen Vorteil von der Therapie hat (Grogan, 2002; Loprinzi, 2001). Und da das Mammakarzinom zur häufigsten Krebserkrankung der Frau zählt, müssen diese Fragen geklärt werden.

Das Mammakarzinom gehört zu den Malignomen, die frühzeitig in regionäre Lymphknoten, in das Skelett, Leber, Lunge, Pleura und Ovar metastasiert. Über den hämatogenen Weg werden sehr früh Tumorzellen in den Organismus geschwemmt (Beitsch, 2000; Brandt, 1998; Racila, 1998). Nicht selten treten auch nach Jahren des rezidivfreien Überlebens Hirnmetastasen auf (Piccirilli, 2007; Saisho, 2005). Einer der wichtigsten Prognosefaktoren hierbei sind die in die axillären Lymphknoten disseminierten Tumorzellen (Braun, 2001b; Pantel, 2004).

Aufgrund der häufigen Metastasierung in das Skelett, gibt es mit disseminierten Tumorzellen aus Knochenmarkanalysen die längste Erfahrung. Doch bei einer Knochenmarkaspiration besteht das gewonnene Material bis zu 90 Prozent aus beigemischtem Blut, womit das Material wenig Aussagekraft zulässt. Langzeitfolgestudien haben zwar ergeben, dass Brustkrebspatientinnen mit epithelialen Tumorzellen im Knochenmark eine ungünstigere Prognose haben (Diel, 1992; Diel, 1996; Janni, 2005a), trotzdem gibt es eine Anzahl von Patientinnen mit einem positiven Knochenmarksbefund, die während des Beobachtungszeitraumes nicht rezidiert sind (Braun, 2005a). Auch unterscheiden sich die Detektionsraten der einzelnen Studien stark und schwanken zwischen 0 Prozent (Fetsch, 2005) und 100 Prozent (Slade, 2005). Somit kann zum jetzigen Zeitpunkt aufgrund fehlender Standardisierung für die individuelle Patientin nicht festgestellt werden, ob die Therapie Erfolg hat oder nicht

(Ditsch, 2002). Zudem ist die Aspiration von Knochenmark für die Patientin unangenehm und risikoreich und mit erheblichem Aufwand und Kosten verbunden (Lacroix, 2006).

Im Gegensatz zur Knochenmarkspunktion ist das Material einer Blutprobe eindeutig definiert. Ausgehend von der Erkenntnis, dass maligne Zellen in das Blutsystem gestreut werden, liegt es nahe, zu versuchen, diese Tumorzellen im Blut zu messen und als Parameter zur Überprüfung des Therapieerfolgs zu verwenden.

Die Entnahme von EDTA-Blut aus der peripheren Vene ist im Gegensatz zur Knochenmarkspunktion für die Patientin risikoarm und kann bei Bedarf wiederholt werden, was von der Patientin eher toleriert wird als eine wiederholte Knochenmarkspunktion. So können zu verschiedenen Zeitpunkten Blutproben analysiert werden.

Diese zirkulierenden epithelialen Tumorzellen können bei Patientinnen mit primärem (Janni, 2005a; Mansi, 1999; Solomayer, 2001) und metastasiertem (Cristofanilli, 2004; Cristofanilli, 2005a; Hayes, 2006) Mammakarzinom nachgewiesen werden. In der Literatur sind sogar Fälle von Malignompatienten beschrieben worden, in denen ein leukämieartiger Anstieg von Tumorzellen im peripheren Blut stattfand (Aboulafia, 1992; Carey, 1976; Gallivan, 1984). Selten treten jedoch auch bei gesunden Probandinnen epitheliale Zellen im peripheren Blut auf (Gaforio, 2003; Pachmann, 2005b). Möglicherweise können hämatologische Zellen aberrant (Gaforio, 2003; Traystman, 1997), Zytokeratin exprimieren, welches eigentlich ein Bestandteil epithelialer Zellen ist. Die bei Tumorpatienten nachgewiesene Zellen sind jedoch fast immer maligne, dies zeigten verschiedene tierexperimentelle Studien. Zum Beispiel wurden in der Studie von (Pretlow, 2000) Tumorzellen von Patienten mit Prostatakarzinom und Kolonkarzinom auf Mäuse übertragen, die daraufhin Metastasen bildeten.

Wie bereits in Kapitel 7.4 beschrieben wurde, wurden in dieser Arbeit die Blutproben mittels MAINTRAC® Methode aufbereitet, die Zellen mit der Laser Scanning Cytometry gezählt und anschließend ausgewertet worden. Die ausschließliche Lokalisation der gebundenen Antikörper auf der Zelloberfläche erhöht die Wahrscheinlichkeit einer spezifischen Bindung.

Andere Methoden, wie die Immunhistochemie, sind für die Analyse der disseminierten Tumorzellen für das Knochenmark und das periphere Blut aufgrund niedriger Zellzahlen wieder verworfen worden (Gilbey, 2004). Bei der Anreicherung mit Magnetpartikeln gehen vermutlich epitheliale Zellen aufgrund ihrer niedrigen Expressionsrate von EpCAM verloren (Rao, 2005). Deswegen wurde die direkte Detektion der Zellen optimiert (Pachmann, 2005b) Damit konnte die Rate an reproduzierbarer Ergebnisse erhöht werden.

Mit der Laser Scanning Cytometrie können wiederholte Analysen des Blutes einer Patientin zu verschiedenen Zeitpunkten im Therapieplan beliebig oft verglichen werden. Das erlaubt Rückschlüsse über verschiedene Aspekte des Therapieansprechens der individuellen Patientin.

Die neoadjuvante Therapie hat das Ziel, die Größe des Tumors vor der Operation zu verkleinern, um ein besseres Operationsergebnis zu erhalten. So konnte in einer vorangehenden Studie nachgewiesen werden, dass die neoadjuvante Therapie die zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut in gleicher Weise beeinflusst wie die Größe des Tumors (Pachmann, 2005a). In dieser Studie (Pachmann, 2005a) ging die Abnahme der Tumorgöße auch mit dem Abfall der zirkulierenden Tumorzellen einher. Somit besteht nach Fehm (Fehm, 2006) ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen. Die weitere Nachfolgeuntersuchung ergab, dass Patientinnen mit einem initial guten Ansprechen auf die neoadjuvante Behandlung (basiert auf Anthrazyklinen), ein verbessertes rezidivfreies Überleben hatten (Camara, 2007).

Ebenfalls wurde beobachtet, dass bei unbehandelten Patientinnen auch nach Jahren ohne Wiederauftreten der Krankheit zirkulierende epitheliale Tumorzellen detektiert werden können (Pachmann, 2005c).

In vorangehenden Studien konnten auch aufgrund der Antwort der zirkulierenden Tumorzellen auf die Therapie, Patientinnen mit einem Risiko zur Entstehung eines Rezidivs von den Patientinnen unterschieden werden, die rezidivfrei blieben (Lobodasch, 2007; Pachmann, 2007).

Nachdem also gezeigt worden war, dass die Tumorzellen im Blut bestimmten Schwankungen unterliegen, lag die Vermutung nahe, dass man mit dieser Methode Rückschlüsse auf das Ansprechen der adjuvanten Chemotherapie der einzelnen Patientinnen ziehen kann.

Dieses Ziel verfolgte die vorliegende Arbeit.

Deshalb wurde in der vorliegenden Untersuchung das Verhalten der zirkulierenden Tumorzellen bei Patientinnen mit primärem Brustkrebs auf die systemische adjuvante Chemotherapie untersucht.

Die Messungen wurden zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und nach jeder Chemotherapiegabe, sowie am Ende der Behandlung vorgenommen.

In der vorliegenden Studie konnten bei allen 91 Patientinnen vor Beginn der Therapie epitheliale Zellen im Blut nachgewiesen werden, was einer Detektionsrate von 100 Prozent entspricht.

In der prospektiven Analyse wurden die Patientinnen weder nach den verschiedenen Therapieschemata noch nach ihrem Krankheitsstadium unterschieden. Anschließend wurden sie gemäß ihres Risikoprofils und des Studiendesigns beobachtet, in das sie einbezogen waren.

Bezüglich des Verhaltens der Zellzahlen auf die Chemotherapie konnten bei den 91 Patientinnen drei Gruppen unterschieden werden:

1. Patientinnen mit gutem Ansprechen auf die Therapie mit einem Abfall der Zellen um mehr als das zehnfache. Nicht bei allen Patientinnen konnte eine komplette Elimination der zirkulierenden epithelialen Tumorzellen erreicht werden. Nur bei einer Patientin dieser Gruppe trat ein Rezidiv auf.
2. Patientinnen mit geringem Ansprechen auf die Therapie, manchmal sogar mit einem leichten Anstieg der Zellzahl. In dieser Gruppe rezidierten fünf Patientinnen. Es liegt nahe anzunehmen, dass die Patientinnen in dieser Gruppe nicht von einer adjuvanten Systemtherapie profitieren. Auf der einen Seite gibt es Patientinnen, die von Grund auf eine gute Prognose haben. Auf der anderen Seite gibt es die Patientinnen, deren Zellen sich ebenfalls nicht ändern und die später trotz Therapie rezidivieren. Daraus ergibt sich die

Frage, ob die Patientinnen aus dieser Gruppe einen Vorteil aus der Chemotherapie ziehen können.

3. Unter die dritte Gruppe fallen Patientinnen, die eigentlich seit Beginn und während der Chemotherapie oder nach kurzem Zellzahlabfall unter der Therapie einen stetigen Anstieg der Zahl der Tumorzellen um mehr das zehnfache des Ausgangswertes aufweisen. Ein Großteil dieser Patientinnen rezidierte trotz systemischer adjuvanter Chemotherapie.

Während der Beobachtungszeit sind 20 Patientinnen rezidiert. Dieses Ergebnis entspricht 22 Prozent. Ähnliche Größenordnungen konnten in vorangehenden Studien festgestellt werden (Lobodasch, 2007; Pachmann, 2007). Rezidive traten, wie in vorhergehenden Berichten bereits beschrieben, bei Patientinnen auf, die weniger günstige prognostische Faktoren hatten. Nur drei Patientinnen mit N0ER+ rezidierten, wobei alle drei einen Anstieg der Tumorzellen zu verzeichnen hatten.

Damit ergab sich, dass der Anstieg der peripher zirkulierenden epithelialen Tumorzellen unter der adjuvanten Chemotherapie signifikant mit der Entstehung eines Rezidivs korreliert ist.

In der dritten Gruppe der vorliegenden Studie sind nicht alle Patientinnen rezidiert, obwohl sie einen deutlichen Zellanstieg aufweisen. Die Beobachtungszeit einiger Patientinnen war noch nicht lang genug und es ist möglich, dass sie in Zukunft noch rezidivieren werden. Das bedeutet, dass die angewandte Chemotherapie keinerlei Erfolg zu haben scheint und die Zellen in ihrem Wachstum nicht inhibieren konnte. Vielleicht ermöglicht dieses Ergebnis, in Zukunft bei diesen Patientinnen auf andere Therapien wie Herceptin oder Hormontherapie zu wechseln und eine Ansiedlung von Zellen in anderen Organen und letztlich auch das Wachstum zu verhindern.

Es kann aber auch sein, dass die Effektivität der Therapie für die manifesten Metastasen und die zirkulierenden epithelialen Tumorzellen unterschiedlich ist.

Eine Patientin mit vornherein ungünstiger Prognose rezidierte nach einem schnellen kurzen Anstieg der Zellen am Ende der Therapie, obwohl die Zellzahl unter der Therapie zuerst um mehr als das zehnfache sank. Von Beginn an hatte sie eine sehr hohe Zahl an zirkulierenden Tumorzellen. Wahrscheinlich sind disseminierte Zellen in entfernten Organen schon vor und/oder nach der Operation zu Metastasen gewachsen, die jedoch aufgrund ihrer Größe bei der Erstdiagnose nicht nachweisbar waren. Die Chemotherapie hatte demnach nur einen zeitlich begrenzten Effekt. Das Wachstum der Metastasen überwog am Ende somit den Effekt der Wachstumshemmung der systemischen adjuvanten Chemotherapie. Am Ende der Therapie waren die Metastasen zu einer Größe herangewachsen, die durch das Metastasen-Screening festgestellt werden konnten.

Bei einem Teil der Patientinnen zeigte sich als ein charakteristisches Verhalten zirkulierender epithelialer Tumorzellen ein initial gutes Ansprechen auf Inhibitoren der DNA Replikation. Grund dafür kann sein, dass ein Großteil dieser Zellen eine hohe proliferative Aktivität ähnlich einem stark proliferativen Tumor hatte (Sawyers, 2005), die gut auf Chemotherapeutika ansprechen. Manche Tumorzellen befinden sich allerdings in einem „schlafähnlichen“ Zustand (Al-Haji, 2003) und sind während dieser Phase nicht in der Lage, Metastasen zu bilden. Der Begriff „Dormancy“ für Tumorzellen wurde eingeführt, um zu erklären, warum manche Patientinnen nach langer rezidivfreier Zeit ohne jegliche Krankheitszeichen plötzlich ein Rezidiv erleiden. Die Hypothese geht davon aus, dass sich die Tumorzellen in einem Zustand befinden, in dem sie nicht proliferieren können (Meltzer, 1990). Es konnte anhand von Tiermodellen (Holmgren, 1995; Shafie, 1981) und am Menschen (Pantel, 1993) nachgewiesen werden, dass bestimmte Faktoren diese Zellen wieder zur Proliferation anregen können.

Ebenfalls konnte bei einigen Patientinnen vor Beginn der Behandlung eine hohe Apoptoserate beobachtet werden (Bernhard, 2001). Der anschließende Wiederanstieg der Zellen trat häufig im Zusammenhang mit der Gabe von Taxanen auf (Campone, 2005). Taxane hemmen die Mitose und sind seit einigen Jahren Bestandteil der Therapie bei Brustkrebspatientinnen sowie bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen,

Ovarialkarzinomen und Melanomen (Einzig, 1991; Holmes, 1991; Murphy, 1993). Zellresistenz gegenüber der vorangehenden Behandlung könnte die Proliferation trotz Einsatzes des neuen Medikamentes aktivieren.

Über Taxane wurde berichtet, dass sie den intratumoralen Flüssigkeitsdruck verringern (Griffon-Etienne, 1999). Möglicherweise können sie verborgene Tumorreste beeinflussen und es kommt zu einer Ausschwemmung von Zellen in die Zirkulation, was wiederum als Anstieg der zirkulierenden Tumorzellen im Blut beobachtet werden kann. Einige dieser Zellen könnten sich dann wieder in entfernten Organen absiedeln und zu neuen Metastasen heranwachsen.

Komarova (Komarova, 2005) und Wodarz sagten voraus, dass Medikamenten-resistente Subklone schon vor Beginn der Therapie existieren. Die Resultate im Rahmen dieser Arbeit stimmen mit der Hypothese überein, dass seltene medikamenten-refraktäre Subklone, die während der Tumorentwicklung entstanden sind, oder auch Tumorstammzellen, eine dominante Tumorphilpopulation unter dem selektiven Druck der Medikamentenbelastung bilden. Die hohe Wahrscheinlichkeit des Wiederauftretens eines Rezidivs deutet an, dass diese resistenten Zellen Fähigkeiten zur Absiedlung und proliferative Fähigkeiten haben.

Viel Aufmerksamkeit wurde in letzter Zeit dem genetischen Profil von Tumoren gewidmet (Zanetti-Dällenbach, 2006). Ausgehend von den Ergebnissen der vorliegenden Studie sollte jedoch nicht nur der molekulare Phänotyp des Primärtumors, sondern eher der der wiederansteigenden Zellpopulation identifiziert werden, um die Sensitivität auf die Therapie zu untersuchen und möglicherweise die Metastasenbildung zu verhindern.

Ein weiterer Grund für den (Wieder)Anstieg der zirkulierenden epithelialen Tumorzellen kann die Streuung von Zellen aus bereits existierenden Metastasen in den Kreislauf sein (Butler, 1975). Wie bereits erwähnt kann es sein, dass sich vorbestehende Metastasen im Status der „Dormancy“ oder unterdrückter Angiogenese befanden und in dieser Zeit nicht sensitiv gegenüber der verabreichten Chemotherapie waren (Naumov, 2003).

Aus der vorliegenden Studie lässt sich sagen, dass eine Langzeitbeobachtung des Verhaltens zirkulierender epithelialer Tumorzellen der Einzelanalyse überlegen ist und dass der Anstieg dieser Zellen um mehr als das zehnfache des Ausgangswertes ein Rezidiv mit hoher Sicherheit voraussagen lässt.

Bei Analyse der Patientinnen aus der vorliegenden Studie hinsichtlich ihrer Tumorgroße, konnte hingegen keine Signifikanz nachgewiesen werden. Die Unterscheidung erfolgte in zwei Gruppen: Gruppe 1 Patientinnen mit T1 vs. Gruppe 2 mit Patientinnen mit T2, T3 und T4. Es zeigte sich, dass die Patientinnen mit T1-Stadium später rezidivieren.

Man könnte also vermuten, dass das Tumorstadium alleine keinen Aufschluss über das Risiko für die Entstehung eines Rezidivs geben kann. Auch die Unterscheidung in Östrogenrezeptor-positive und Östrogenrezeptor-negative Patientinnen erbrachte hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens keinen signifikanten Unterschied in diesen beiden Gruppen. Nur der Nodalstatus scheint in der Lage zu sein, Aufschluss über die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs zu geben. Nodal-negative Patientinnen hatten eine signifikant längere rezidivfreie Überlebenszeit als nodal-positive Patientinnen. Außerdem ist aus den vorliegenden Ergebnissen und anderer Beobachtungen (Meng, 2004; Pachmann, 2005c) ersichtlich, dass es abhängig vom Wachstumspotential der Tumorzellen nicht möglich oder notwendig ist, alle suspekten Zellen zu eliminieren, um eine lang anhaltende Remission zu erlangen.

Da das Mammakarzinom zur häufigsten Krebserkrankung der Frau gehört, ist es äußerst wichtig, das Blut der Patientinnen auf einen erneuten Anstieg der Tumorzellen, als Indikator für ein drohendes Rezidiv, regelmäßig zu kontrollieren.

Mit einer einmaligen Messung der zirkulierenden Zellen ist es nicht möglich, eine dynamische Entwicklung dieser Zellen während der Therapie festzustellen. Doch mit dieser Langzeitstudie konnte bestätigt werden, dass sich die Tumorzellzahl unter der systemischen adjuvanten Chemotherapie verändert und somit das Monitoring der zirkulierenden epithelialen Tumorzellen ein nützliches Werkzeug ist und sich zur Überwachung der adjuvanten Therapie eignet.

10 Schlussfolgerung

Mit der Frage, ob das Ansprechen einzelner Patientinnen auf die Chemotherapie überprüft werden kann, wurde bei 91 Patientinnen mit primärem Brustkrebs, die mit adjuvanter Chemotherapie behandelt wurden, Blut entnommen und auf zirkulierende epitheliale Tumorzellen mit Hilfe der MAINTRAC® Methode untersucht.

Bei allen Patientinnen wurden solche Zellen im peripheren Blut nachgewiesen.

Dabei konnten die Patientinnen aufgrund des Verhaltens der Tumorzellzahl auf die Therapie in drei Gruppen unterschieden werden.

1. Patientinnen, die einen Abfall der Zellen zu verzeichnen hatten.
2. Patientinnen, bei denen kaum ein Unterschied zum Ausgangswert der Zellzahl zu beobachten war.
3. Patientinnen, die während der Therapie und zum Ende der Therapie hin einen Zellanstieg hatten aufwiesen.

Anhand dieser Ergebnisse konnte die These bestätigt werden, dass Patientinnen mit einem Zellanstieg mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv erleiden. Das wiederum bedeutet, dass diese Gruppe der Patientinnen mit großer Wahrscheinlichkeit keinen Gewinn, und wenn dann nur ein zeitlich begrenztes, aus der derzeitigen Therapie in Bezug auf das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben hat.

Genauso verhält es sich bei den Patientinnen, bei denen kaum eine Änderung in ihrer Zellzahl nachweisbar war.

Hingegen haben Patientinnen mit einem Abfall der Zellzahl ein deutlich besseres Outcome und sprechen somit sehr gut auf die angewandte Chemotherapie an.

Diese Studie hat somit gezeigt, dass die Veränderung der Zahl der zirkulierenden epithelialen Tumorzellen mit der rezidivfreien Überlebenszeit korreliert.

Abschließend lässt sich sagen, dass in der vorliegenden Studie ein Nachweis erbracht worden ist, dass die Messung der zirkulierenden epithelialen Tumorzellen im peripheren Blut durchaus als Werkzeug zur Überprüfung des Ansprechens auf die systemische adjuvante Chemotherapie der individuellen Patientin und als Prognosefaktor für Auftreten eines Rezidivs genutzt werden kann.

11 Ausblick

Die Detektionsrate der zirkulierenden Tumorzellen zeigt in verschiedenen Studien starke Unterschiede. Daher wird es immer wichtiger, die Messmethode zu standardisieren (Gaforio, 2003), da die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass eine Korrelation zwischen rezidivfreien Überleben und Tumorzellzahl existiert.

Auch muss geklärt werden, inwieweit das Verhalten der zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut als Prognosefaktor etabliert werden kann.

Für die Zukunft ist es wichtig zu wissen, welche Patientin von der adjuvanten Chemotherapie profitiert. Es muss ein erstes Ziel für folgende Studien sein, für die Patientinnen, bei denen kein Gewinn aus der Therapie erkennbar war, herauszufinden, ob eine Änderung der Therapiestrategie das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben verlängern könnten.

Die Ergebnisse dieser Studie mögen dazu beitragen, die Forschung in diesem Bereich weiter voranzubringen.

12 Literaturverzeichnis

(EBCTCG), E. B. C. T. C. G. (2005). "Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials." The Lancet **365**(9472): 1687-1717.

Aboulafia, D. M. (1992). "Carcinocythemia: A Terminal Manifestation of Metastatic Breast Cancer." The Western Journal of Medicine **157**(6): 672-674.

Al-Haji, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., Clarke, M.F. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(7): 3983-3988.

Antoniou, A. C., Pharoah, P.D.P., Narod, S., Risch, H.A., Eyfjord, J.L., Hopper, J.E., Ison, H., Johannsson, O., Borg, Å., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D.M., Tang, N., Olah, E., Anton-Culver, H., Warner, E., Lubinski, J., Gronwald, J., Gorski, B., Tulinius, H., Thorlacius, S., Eerola, H., Nevanlinna, H., Syrjäkoski, K., Kallioniemi, O.-P., Thompson, D., Evans, C., Peto, J., Lalloo, F., Evans, D.G., Easton, D.F. (2005). "Breast and ovarian cancer risks to carriers of the BRCA1 5382insC and 185delAG and BRCA2 6174delT mutations: a combined analysis of 22 population based studies." Journal of Medical Genetics **42**: 602-603.

Asworth, T. R. (1869). "A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death." Australien Medical Journal **14**: 146-149.

Bae, J. W., Choi, K.H., Kim, H.G., Park, S.H. (2000). "The detection of circulating breast cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction." Journal of Korean Medical Science **15**(2): 194-198.

Bauer, K. S., Oberhoff, C., Schindler A.E., Seeber, S. (2002). "A summary of two clinical studies on tumor cell dissemination in primary and metastatic breast cancer: Methods, prognostic significance and implication for alternative treatment protocol." International Journal of Oncology **20**: 1027-1034.

Becker, N. (2001). "Development of the incidence and mortality of breast cancer." Radiologe **41**(4): 337-343.

Beitsch, P. D., Clifford, E. (2000). "Detection of carcinoma cells in the blood of breast cancer patients." American Journal of Surgery **180**(6): 446-448.

Bernhard, E. J., Muschel, R.J. (2001). "Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency." Cancer Research **61**: 333-338.

Bischoff, J., Rosenberg, R., Dahm, M., Janni, W., Gutschow, K. (2003). "Minimal residual disease in bone marrow and peripheral blood of patients

with metastatic breast cancer." Rescent Results in Cancer Research **162**: 135-140.

Bonadonna, G., Brusamolino, E., Valagussa, P., Rossi, A., Brugnatelli, L., Brambilla, C., DeLena, M., Tancini, G., Bajetta, E., Musumeci, R., Veronesi, U. (1976). "Combination chemotherapy as an adjuvant treatment in operable breast cancer." The New England Journal of Medicine **294**(8): 405-410.

Bonadonna, G., Moliterni, A., Zambetti, M., Daidone, M.G., Pilotti, S., Gianni, L., Valagussa, P. (2005). "30 years' follow up of randomised studies of adjuvant CMF in operable breast cancer: cohort study." BMJ **330**: 217-223.

Brandt, B., Roetger, A., Heidl, S., Jackisch, C., Lelle, R.J., Assmann, G., Zänker, K.S. (1998). "Isolation of blood-borne epithelium-derived c-erbB-2 oncoprotein-positive clustered cells from the peripheral blood of breast cancer patients." International Journal of Oncology **76**(6): 824-828.

Braun, S., Cevatli, B.S., Assemi, C., Janni, W., Kentenich, C.R., Schindlbeck, C., Rjosk, D., Hepp, F. (2001b). "Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy." Journal of Clinical Oncology **19**(5): 1468-1475.

Braun, S., Pantel, K. (2001a). "Clinical Significance of Occult Metastatic Cells in Bone Marrow of Breast Cancer Patients." The Oncologist **6**: 125-132.

Braun, S., Vogl, F.D., Naume, B., Janni, W., Osborne, M.P., Coombes, R.C., Schlimok, G., Diel, I.J., Gerber, B., Gebauer, G., Pierga, J.Y., Marth, C., Oruzio, D., Wiedswang, G., Solomayer, E.-F., Kundt, G., Strobl, B., Fehm, T., Wong, G.Y., Bliss, J., Vincent-Salomon, A., Pantel, K. (2005a). "A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer." The New England Journal of Medicine **353**(8): 793-802.

Butler, T. P., Gullino, P.M. (1975). "Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinomas." Cancer Research **35**: 512-516.

Camara, O., Kavallaris, A., Nöschel, H., Rengsberger, M., Jörke, C., Pachmann, K. (2006). "Seeding of epithelial cells into circulation during surgery for breast cancer: the fate of malignant and benign mobilized cells." World Journal of Surgical Oncology **4**(67): 1-7.

Camara, O., Rengsberger, M., Egbe, A., Koch, A., Gajda, M., Hammer, U., Jörke, C., Rabenstein, C., Untch, M., Pachmann, K. (2007). "The relevance of circulating epithelial tumor cells (CETC) for therapy monitoring during neoadjuvant (primary systemic) chemotherapy in breast cancer." Annals of Oncology **18**(9): 1484-1492.

Campone, M., Fumoleau, P., Bouzbouloux, E., Kerbrat, P., Roché, H. (2005). "Taxanes in adjuvant breast cancer setting: which standard in Europe?" Critical Reviews in Oncology/Hematology **55**(3): 167-175.

Carey, R. W., Taft, P.D., Bennett, J.M., Kaufman, S. (1976). "Carcinocythemia (carcinoma cell leukemia). An acute leukemia-like picture due to metastatic carcinoma cells." the American Journal of Medicine **60**(2): 273-278.

Castells, A., Boix, L., Bessa, X., Gargallo, L., Pique, J.M. (1998). "Detection of colonic cells in peripheral blood of colorectal cancer patients by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction." British Journal of Cancer **78**(10): 1368-1372.

Chambers, A., Maumov, G., Vantyghem S. (2000). "Molecular biology of breast cancer metastasis." Breast Cancer Research **2**(6): 400-407.

Choy, A., McCulloch, P. (1996). "Induction of tumour cell shedding into effluent venous blood breast cancer surgery." British Journal of Cancer **73**(1): 79-82.

Cristofanilli, M., Budd, G.T., Ellis, M.J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M.C., Reuben, J.M., Doyle, G.V., Allard, W.J., Terstappen, L.W., Hayes, D.F. (2004). "Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer." The New England Journal of Medicine **351**(8): 781-791.

Cristofanilli, M., Hayes, D.F., Budd, G.T., Ellis, M.J., Stopeck, A., Reuben, J.M., Doyle, G.V., Matera, J., Allard, W.J., Miller, M.C., Fritzsche, H.A., Hortobagyi, G.N., Terstappen, L.W. (2005a). "Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer." Journal of Clinical Oncology **23**(7): 1420-1430.

Dellapasqua, S., Colleoni, M., Castiglione, M., Goldhirsch, A. (2007). "New Criteria for Selecting Elderly Patients for Breast Cancer Adjuvant Treatment Studies " The Oncologist **12**: 952-959.

Demicheli, R., Bonadonna G., Hrushesky W.J.M., Retsky, M.W., Valagussa, P. (2004). "Menopausal status dependence of the timing of breast cancer recurrence after surgical removal of the primary tumour." Breast Cancer Research **6**(6): 689-696.

Denis, M., Tessier, M., Dreno, B., Lustenberger, P. (1996). "Circulating micrometastases following oncological surgery." Lancet **347**: 913.

Diel, I. J., Kaufmann, M., Costa, S.D., Holle, R., von Minckwitz, G., Solomayer, E.-F., Kaul, S., Bastert, G. (1996). "Micrometastatic Breast Cancer Cells in Bone Marrow at Primary Surgery: Prognostic Value in Comparison With Nodal Status." Journal of the National Cancer Institute **88**(22): 1652-1658.

Diel, I. J., Kaufmann, M., Costa, S.D., Kaul, S., Bastert, G. (1992). "Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis." Journal of Clinical Oncology **10**(10): 1534-1539.

Ditsch, N., Funke, I., Mayer, B., Untch, M. (2002). "Detection of disseminated tumor cells in bone marrow--currently of no practical therapeutic value." MMW Fortschritte der Medizin **144**(14): 37-39.

Earl, H., Iddawela M. (2004). "Epirubicin as adjuvant therapy in breast cancer." Expert Review of Anticancer Therapy **4**(2): 189-195.

Einzig, A. I., Wiemik, P.H., Schwartz, E.L. (1991). "Taxol: a new agent active in melanoma and ovarian cancer." Cancer Treatment Research **58**: 89-100.

Engell, H. (1955). "Cancer cells in the circulating blood." Acta chirurgica Scandinavica **201**.

Fehm, T., Becker, S., Becker-Pergola, G., Sotlar, K., Gebauer, G., Dürr-Störzer, S., Neubauer, H., Wallwiener, D., Solomayer, E.-F. (2006). "Presence of apoptotic and nonapoptotic disseminated tumor cells reflects the response to neoadjuvant systemic therapy in breast cancer." Breast Cancer Research **9**: 60.

Fehm, T., Sagalowsky, A., Clifford, E., Beitsch, P., Saboorian, H., Euhus, D., Meng, S., Morrison, L., Tucker, T., Lane, N., Ghadimi, B.M., Heselmeyer-Haddad, K., Ried, T., Rao, C., Uhr, J. (2002). "Cytogenetic Evidence That Circulating Epithelial Cells in Patients with Carcinoma Are Malignant." Clinical Cancer Research **8**: 2073-2084.

Fetsch, P. A., Cowan, K.H., Weng, D.E., Freifield, A., Filie, A.C., Abati, A. (2005). "Detection of circulating tumor cells and micrometastases in stage II, III, and IV breast cancer patients utilizing cytology and immunocytochemistry." Diagnostic Cytopathology **22**(5): 323-328.

Finkel, G. C., Tishkoff, G.H. (1960). "Malignant cells in a peripheral blood smear: report of a case." The New England Journal of Medicine **28**(262): 187-188.

Gaforio, J. J., Serrano, M.J., Sanchez-Rovira, P., Sirvent, A., Delgado-Rodriguez, M., de la Torre, N., Algarra, I., Duenas, R., Lozano, A. (2003). "Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis." International Journal of Oncology **107**(6): 984-990.

Gallivan, M. V. E., Lokich, J. (1984). "Carcinocythemia (carcinoma cell leukemia)-Report of two cases with English literature review." Cancer **53**: 1100-1102.

Gilbey, A. M., Burnett, D., Coleman, R.E., Holen, I. (2004). "The detection of circulating breast cancer cells in blood." Journal of Clinical Pathology **57**: 903-911.

Glaves, D. (1983). "Correlation between circulating cancer cells and incidence of metastases." British Journal of Cancer **48**(5): 665-673.

Griffon-Etienne, G., Boucher, Y., Brekken, C., Suit, H.D., Jain, R.K. (1999). "Taxane-induced Apoptosis Decompresses Blood Vessels and Lowers Interstitial Fluid Pressure in Solid Tumors: Clinical Implications." Cancer Research **59**: 3776-3782.

Grogan, M., Tabar, L., Chua, B., Chen, H.H., Boyages, J. (2002). "Estimating the benefits of adjuvant systemic therapy for women with early breast cancer." The British Journal of Surgery **88**(11): 1513-1518.

Guadagni, F., Kantor, J., Aloe, S., Carone, M.D., Spila, A., D'Alessandro, R., Abbolito, M.R., Cosimelli, M., Graziano, F., Carboni, F., Carlini, S.,

Perri, P., Sciarretta, F., Greiner, J.W., Kashmiri, S.V., Steinberg, S.M., Roselli, M., Schlom, J. (2001). "Detection of blood-borne cells in colorectal cancer patients by nested reverse transcription-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen messenger RNA: longitudinal analyses and demonstration of its potential importance as an adjunct to multiple serum markers." Cancer Research **61**(6): 2523-2532.

Hansen, E., Wolff, N., Knuechel, R., Ruschoff, J., Hofstaedter, F., Taeger, K. (1995). "Tumorcells in blood shed from the surgical field." Cancer **88**(10): 2252-2259.

Hayes, D. F., Cristofanilli, M., Budd, G.T., Ellis, M.J., Stopeck, A., Miller, M.C., Matera, J., Allard, W.J., Doyle, G.V., Terstappen, L.W.W.M. (2006). "Circulating Tumor Cells at Each Follow-up Time Point during Therapy of Metastatic Breast Cancer Patients Predict Progression-Free and Overall Survival." Clinical Cancer Research **12**(14): 4218-4224.

Holmes, F. A., Walters, R.L., Theriault, R.L., Forman, A.D., Newton, L.K., Raber, M.N., Buzdar, A.U., Frye, D.K., Hortobagyi, G.N. (1991). "Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer." Journal of the National Cancer Institute **83**: 1797-1805.

Holmgren, L., O'Reilly, M.S., Folkman, J. (1995). "Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression." Nature Medicine **1**: 149-153.

Janni, W., Rack, B., Lindemann, K., Harbeck, N. (2005b). "Detection of Micrometastatic Disease in Bone Marrow: Is it Ready for Prime Time?" The Oncologist **10**(7): 480-492.

Janni, W., Rack, B., Schindlbeck, C., Strobl, B., Rjosk, D., Braun, S., Sommer, H., Pantel, K., Gerber, B., Friese, K., (2005a). "The Persistence of Isolated Tumor Cells in Bone Marrow from Patients with Breast Carcinoma Predicts an Increased Risk for Recurrence." Cancer **103**: 884-891.

Jones, L. A. (2005). "Reduction in mortality from breast cancer." BMJ **330**: 205-206.

King, M.-C., Marks, J.H., Mandell, J.B., The New York Breast Cancer Study Group3 (2003). "Breast and Ovarian Cancer Risks Due to Inherited Mutations in BRCA1 and BRCA2." Science **302**(5645): 643-646.

Komarova, N., Wodarz, D. (2005). "Drug resistance in cancer: Principles of emergence and prevention." Proc Natl Acad Sci USA **102**(27): 9714-9719.

Kubens, B. S., Feldner, J.C., Brandt, B., Zänker, K.S. (2002). "Migrating and circulating breast carcinoma cells are within active phases of the cell cycle." Anticancer Research **22**(2A): 899-903.

Kvalheim, G. (1996). "Detection of occult tumor cells in bone marrow and blood in breast cancer patients." Acta oncologica **35**(8): 13.

Lacroix, M. (2006). "Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells." Endocrine-Related Cancer **13**: 1033-1067.

Lalle, M., DeRosa, L., Marzetti, L., Montuoro, A. (2000). "Detection of breast cancer cells in the bone marrow or peripheral blood: methods and prognostic significance." Tumori **86**(3): 183-190.

Langston, A. A., Malone, K.E., Thompson, J.D., Daling, J.R., Ostrander, E.A. (1996). "BRCA1 Mutations in a Population-Based Sample of Young Women with Breast Cancer." The New England Journal of Medicine **334**(3): 137-142.

Lobodasch, K., Fröhlich, F., Rengsberger, M., Schubert, R., Dengler, R., Pachmann, U., Pachmann, K. (2007). "Quantification of circulating tumour cells for the monitoring of adjuvant therapy in breast cancer: an increase in cell number at completion of therapy is a predictor of early relapse." The Breast **16**(2): 211-218.

Loprinzi, C. L., Thomé, S.D. (2001). "Understanding the Utility of Adjuvant Systemic Therapy for Primary Breast Cancer." Journal of Clinical Oncology **19**(4): 972-979.

Mansi, J. L., Gogas, H., Bliss, J.M., Gazet, J.C., Berger, U., Coombes, R.C. (1999). "Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study." The Lancet **354**(9174): 197-202.

Martin, M., Villar, A., Sole-Calvo, A., Gonzalez, R., Massuti, B., Lizon, J., Camps, C., Carrato, A., Casado, A., Candel, M.T., Albanell, J., Aranda, J., Munarriz, B., Cambell, J., Diaz-Rubio, E., GEICAM Group (2003). "Doxorubicin in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. FAC regimen, day 1, 21) versus methotrexate in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. CMF regimen, day 1, 21) as adjuvant chemotherapy for operable breast cancer: a study by the GEICAM group." Annals of Oncology **14**(6): 833-842.

Meltzer, A. (1990). "Dormancy and breast cancer." Journal of Surgical Oncology **43**(181-188).

Meng, S., Tripathy, D., Frenkel, E.P., Shete, S., Naftalis, E.Z., Huth, J.F., Beitsch, P.D., Leitsch, M., Hoover, S., Euhus, D., Haley, B., Morrison, L., Fleming, T.P., Herlyn, D., Terstappen, L.W.M.M., Fehm, T., Tucker, T.F., Lane, N., Wang, J., Uhr, J.W. (2004). "Circulating Tumor Cells in Patients with Breast Cancer Dormancy." Clinical Cancer Research **10**: 8152-8162.

Morgan, T. M., Lange, P.H., Vessella, R.L. (2007). "Detection and characterization of circulating and disseminated prostate cancer cells." Frontiers in Bioscience **12**: 3000-3009.

Müller, V., Stahmann, N., Riethdorf, S., Rau, T., Zabel, T., Goetz, A., Jänicke, F., Pantel, K. (2005). "Circulating Tumor Cells in Breast Cancer: Correlation to Bone Marrow Micrometastases, Heterogeneous Response to Systemic Therapy and Low Proliferative Activity." Clinical Cancer Research **11**: 3678-3685.

Murphy, W. K., Fossella, F.V., Winn, R.J., Shin, D.M., Hynes, H.E., Gross, H.M., Davilla, E., Leimert, J., Dhingra, H., Raber, M.N., Krakoff, H.I., Hong, W.K. (1993). "Phase II study of taxol in patients with untreated

advanced non small lung cancer." Journal of the National Cancer Institute **85**: 384-388.

Naumov, G. N. (2003). "Ineffectiveness of doxorubicin treatment on solitary dormant mammary carcinoma cells or late-developing metastases." Breast Cancer Research **82**: 199-206.

Newman, B., Mu, H., Butler, L.M., Millikan, R.C., Moorman, P.G., King, M.-C. (1998). "Frequency of Breast Cancer Attributable to BRCA1 in a Population-Based Series of American Women." The Journal of the American Medical Association **279**(12): 915-921.

Nq, R., Green, M.D. (2007). "Managing cardiotoxicity in anthracycline-treated breast cancers." Expert Opinion on Drug Safety **6**(3): 315-321.

Pachmann, K. (2005c). "Longtime Recirculating Tumor Cells in Breast Cancer Patients." Clinical Cancer Research **11**: 5657-5658.

Pachmann, K., Camara, O., Kavallaris, A., Schneider, U., Schünemann, S., Höffken, K. (2005a). "Quantification of the response of circulating epithelial cells to neoadjuvant treatment for breast cancer: a new tool for therapy monitoring." Breast Cancer Research **7**: 975-979.

Pachmann, K., Clement, J.H., Schneider, C.-P., Willen, B., Camara, O., Pachmann, U., Höffken, K. (2005b). "Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer." Clinical Chemistry and Laboratory Medicine **43**: 617-627.

Pachmann, K., Dengler, R., Lobodasch, K., Fröhlich, F., Kroll, T., Rengsberger, M., Schubert, R., Pachmann, U. (2007). "An increase in cell number at completion of therapy may develop as an indicator of early relapse : Quantification of circulating epithelial tumor cells (CETC) for monitoring of adjuvant therapy in breast cancer." Journal of Cancer Research and Clinical Oncology **5**.

Pachmann, K., Heiß, P., Demel, U., Tilz, G. (2001). "Detection and enumeration of minimal numbers of circulating tumour cells in peripheral blood using Laser Scanning Cytometry (LSC)." Clinical Chemistry and Laboratory Medicine **39**: 811-817.

Pantel, K., Brakenhoff, R.H. (2004). "Dissecting the Metastatic Cascade." Nature Reviews Cancer **4**: 448-456.

Pantel, K., Müller, V., Auer, M., Nusser, N., Harbeck, N., Braun, S. (2003). "Detection and Clinical Implications of Early Systemic Tumor Cell Dissemination in Breast Cancer." Clinical Cancer Research **9**: 6326-6334.

Pantel, K., Schlimok, G., Braun, S. (1993). "Differential expression of proliferative-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells." Journal of the National Cancer Institute **85**: 1419-1424.

Peto, J., Collins, N., Barfoot, R., Seal, S., Warren, W., Rahman, N., Easton, D.F., Evans, C., Deacon, J., Stratton, M.R. (1999). "Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Gene Mutations in Patients With Early-Onset Breast Cancer." Journal of the National Cancer Institute **91**(11): 943-949.

Piccirilli, M., Sassun, T.E., Brogna, C., Giangaspero, F., Salvati, M. (2007). "Late brain metastases from breast cancer: clinical remarks on 11 patients and review of the literature." Tumori **93**(2): 150-154.

Pretlow, T. G., Schwartz, S., Giacona, J.M., Wright, A.L., Grimm, H.A., Edgehose, N.L., Murphy, J.R., Markowitz, S.D., Jamison, J.M., Summers, J.L., Hamlin, C.R., MacLennan, G.T., Resnick, M.I., Pretlow, T.P., Connell, C.F. (2000). "Prostate cancer and other xenografts from cells in peripheral blood of patients." Cancer Research **60**(15): 4033-4036.

Racila, E., Euhus, D., Weiss, A.J., Rao, C., McConnell, J., Terstappen, L.W.M.M., Uhr, J.W. (1998). "Detection and characterization of carcinoma cells in the blood." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**: 4589-4594.

Rao, C. G., Chainese, D., Doyle, G.V., Miller, M.C., Russell, T., Sanders, R.A. Jr., Terstappen, L.W.M.M. (2005). "Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary metastatic tumors." International Journal of Oncology **27**(1): 49-57.

Saisho, S., Takashima, S., Oshumi, S., Saeki, H., Aogi, K., Saeki, T., Mandai, K., Iwata, S., Takeda, T. (2005). "Two cases with long-term disease-free survival after resection and radiotherapy for solitary brain metastasis from breast cancer with extensive nodal metastases." Breast Cancer (Tokyo, Japan) **12**(3): 221-225.

Sawyers, C. L. (2005). "Calculated resistance on cancer." Nature Medicine **11**: 824-825.

Shaag, A., Walsh, T., Renbaum, P., Kirchhoff, T., Nafa, K., Shiovitz, S., Mandell, J.B., Welsch, B., Lee, M.K., Ellis, N., Offit, K., Levy-Lahad, E., King, M.-C. (2005). "Functional and genomic approaches reveal an ancient CHEK2 allele associated with breast cancer in the Ashkenazi Jewish population." Human Molecular Genetics **14**(4): 555-563.

Shafie, S. M., Grantham, F.H. (1981). "Role of hormones in the growth and regression of human breast cancer cells (MCF-7) transplanted into athymic nude mice." Journal of the National Cancer Institute **67**: 51-56.

Shimizu, C., Watanabe, T. (2002). "Recent advance in adjuvant therapy for breast cancer." Gan To Kagaku Ryoho **29**(13): 2458-2469.

Slade, M. J., Singh, A., Smith, B.M., Tripuraneni, G., Hall, E., Peckitt, C., Fox, S., Graham, H., Luchtenborg, M., Sinnett, H.D., Cross, N.C., Coombes, R.C. (2005). "Persistence of bone marrow micrometastasis in patients receiving adjuvant therapy for breast cancer: results at 4 years." International Journal of Cancer **114**: 94-100.

Solomayer, E.-F., Diel, I.J., Salanti, G., Hahn, M., Gollan, C., Schütz, F., Bastert, G. (2001). "Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients." Clinical Cancer Research **7**: 4102-4108.

Taubert, H., Blümke, K., Bilkenroth, U., Meye, A., Kutz, A., Bartel, F., Lautenschläger, C., Ulbrich, E., Nass, N., Holzhausen, H., Koelbl, H., Lebrecht, A. (2004). "Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: Correlation to nodal status and occurrence of metastases." Gynaecologic Oncology **92**: 256-261.

Terstappen, L. W. M. M., Rao, C., Gross, S., Weiss, A.J. (2000). "Peripheral blood tumor cell load reflects the clinical activity of the disease in patients with carcinoma of the breast." International Journal of Oncology **17**(3): 573-578.

Traystman, M. D., Chochran, G.T., Hake, S.J., Kuszynski, C.A., Mann, S.L., Murphy, B.J. (1997). "Comparison of molecular cytokeratin 19 reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunocytochemical detection of micrometastatic breast cancer cell in haematopoietic harvests." Journal of Hematotherapy **6**: 551-561.

Uchikura, K., Takao, S., Nakajo, A., Miyazono, F., Nakashima, S., Tokuda, K., Matsumoto, M., Shinchii, H., Natsugoe, S., Aikou, T. (2002). "Intraoperative molecular detection of circulating tumor cells by reverse transcription-polymerase chain reaction in patients with biliary-pancreatic cancer is associated with haematogenous metastasis." Annals of Surgical Oncology **9**(4): 364-370.

Zach, O., Kasparu, H., Wagner, H., Krieger, O., Lutz, D. (2002). "Prognostic value of tumour cell detection in peripheral blood of breast cancer patients." Acta medica Austriaca. Supplement **59**: 32-34.

Zanetti-Dällenbach, R., Vuaroqueaux, V., Wight, E., Labuhn, M., Singer, G., Urban, P., Eppenberger, U., Holzgreve, W., Eppenberger-Castori, S. (2006). "Comparison of gene expression profiles in core biopsies and corresponding surgical breast cancer samples." Breast Cancer Research **8**(4): R51.

Zieglschmid, V., Hollmann, C., Böcher, O. (2005). "Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood." Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences **42**(2): 155-196.

Zielinski, C., Beslija, S., Krmpotic, Z.M., Jaskiewicz-Welnicka, M., Wiltschke, C., Kahan, Z., Grgic, M., Tzekova, V., Inbar, M., Cervek, J., Chernochensky, I., Szanto, J., Spanik, S., Wagnerova, V., Ghilezan, N., Pawlega, J., Vrbanc, D., Khamtsov, D., Soldatenkova, V., Brodowicz, T. (2005). "Gemcitabine, epirubicin and paclitaxel, versus fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide as first-line chemotherapy in metastatic breast cancer: A central european cooperative oncology group international, multicenter, prospective, randomized phase III trial." Journal of Clinical Oncology **23**: 1401-1408.

13 Anhang der Dissertation

Tabellen

Tumorklassifikation nach TNM (2002)

Tabelle 10: pT - Primärtumor

pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ: intraduktales Karzinom oder lobuläres Carcinoma in situ oder M. Paget der Mamille ohne nachweisbaren Tumor
pTis (DCIS)	duktales Carcinoma in situ
pTis (LCIS)	lobuläres Carcinoma in situ
pTis (Paget)	Paget-Erkrankung der Brustwarze ohne erkennbaren Tumors)
pT1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT1mic	Mikroinvasion 0,1 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT1a	Mehr als 0,1 cm, aber nicht mehr als 0,5 cm in größter Ausdehnung
pT1b	Mehr als 0,5 cm, aber nicht mehr als 1 cm in größter Ausdehnung
pT1c	Mehr als 1 cm, aber nicht mehr als 2 cm in größter Ausdehnung
pT2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
pT3	Tumor mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
pT4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut, soweit unter T4a bis T4d beschrieben
pT4a	Mit Ausdehnung auf die Brustwand
pT4b	Mit Ödem (einschl. Apfelsinenhaut) oder Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut der gleichen Brust
pT4c	Kriterien 4a und 4b gemeinsam
pT4d	Entzündliches (inflammatorisches) Karzinom

Tabelle 11: pN – Regionäre Lymphknoten

pNX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden (z.B. vor klinischer Klassifikation bioptisch entfernt)
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1mic	Mikrometastase(größer als 0,2mm, aber nicht größer als 2mm in größter Ausdehnung)
pN1	Metastase(n) in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und/oder ipsilaterale Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischen/-r Metastase(n), die bei der Sentinel-Lymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch erkennbar waren
pN1a	Metastase(n) in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten, zumindest eine größer als 2mm in größter Ausdehnung
pN1b	Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischen/-r Metastase(n), die bei der Sentinel-Lymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch erkennbar waren
pN1c	Metastase(n) in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und ipsilaterale Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mikroskopischen/-r Metastase(n), die bei der Sentinel-Lymphknoten-Dissektion entdeckt wurden, aber nicht klinisch erkennbar waren
pN2	Metastase(n) in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
pN2a	Metastase(n) in 4-9 ipsilateralen axillären Lymphknoten, zumindest eine größer als 2mm in größter Ausdehnung
pN2b	Metastase(n) in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
pN3	Metastase(n) in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten; oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten oder in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase; oder mehr als 3 axilläre Lymphknotenmetastasen mit klinisch nicht erkennbaren/-r, mikroskopisch nachweisbaren/-r Metastase(n) in Lymphknoten der A. mammaria interna; oder Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten
pN3a	Metastase(n) in mindestens 10 ipsilateralen axillären Lymphknoten (zumindest eine größer als 2mm in größter Ausdehnung) oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten
pN3b	Metastase(n) in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna bei Vorliegen von mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase oder Metastasen in mehr als 3 axilläre Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, nachgewiesenen Sentinel-Lymphknoten-Dissektion, aber nicht klinisch erkennbar
pN3c	Metastase(n) in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten

Tabelle 12: M – Fernmetastasen

MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 13: Patientenauswahl (zeigt die demografischen Daten sowohl in Absolut- als auch in Prozentwerten)

	Wert	Prozent
Geschlecht		
Frauen	91	100%
Männer	0	0%
Alter (in Jahren)	Jahre	
Minimum	30	
Maximum	76	
Mittel	55	
Tumorgröße	Patientinnen	
T1	53	58,2%
T2	30	32,9%
T3	4	4,4%
T4	4	4,4%
Lymphknotenstatus	Patientinnen	
N0	46	50,6%
N1	36	39,6%
N2	5	5,5%
N3	3	3,3%
Nx	1	1,1%
Rezeptorstatus	Patientinnen	
ER negativ	36	39,6%
ER positiv	55	60,4%
Rezidiv bis Dez. 2005	Patientinnen	
	20	23,1%
Rezidivfreies Überleben	Tage	
Minimum	71	
Maximum	833	
Mittel	386	

Tabelle 14: Chemotherapieschemata in Zusammenhang mit Verhalten der ZTZ

Therapie	No Pts	Tumorstadium	Anstieg	Gleich bleibend	Abfall	CR	Rezidiv
FEC (32)	18	T1N0	6	6	6	18	
	5	T1N1	2	1	2	4	1
	3	T2N0	1	1	1	3	
	3	T2N1	1	1	1	3	
	1	T3N1		1			1
	1	T4N0	1				1
	1	T4N1			1	1	
FEC/Tax (9)	4	T1N0	1		1	1	1
	1	T2N0		1		1	
	2	T2N1	1		1	1	1
	1	T2N2			1	1	
	1	T2N3	1			1	
FEC/Tax+Gemcitabine(1)	1	T1N0			1	1	
EC (7)	2	T1N0		1	1	2	
	2	T1N1	1		1	2	
	1	T2N1	1			1	
	1	T2N2			1	1	
	1	T4N3		1			1
EC/Tax (17)	3	T1N0	1	1	1	1	2
	5	T1N1	4	1		2	3
	8	T2N1	3	4	1	5	3
	1	T3N1		1			1
ET (4)	1	T1N0			1	1	
	1	T2N0	1			1	
	1	T2N1			1		1
	1	T3N1		1			1
E/C/T (2)	2	T1N1	1	1		2	
EC/CMF(2)	1	T1N1		1		1	
	1	T2N1		1		1	
CMF (8)	5	T1N0	1	3	1	5	
	2	T2N0		1	1	2	
	1	T2N1	1				1
Capecitabine (4)	3	T2N1	1		2	3	
	1	T4N0		1		1	
EF (1)	1	T2N1	1			1	
6xDoc (1)	1	T1N0	1				1
observation(3)	3	T1N0	1	1	1	2	1
unbekannt (1)	1	T3N0		1		1	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Leukozyten und Epithelialzellen in 20xfacher Vergrößerung	18
Abbildung 2: Artefakte, Leukozyten und Epithelialzellen in 40xfacher Vergrößerung	19
Abbildung 3: Abfall der Zellzahl > 10fache.....	23
Abbildung 4: Geringe Veränderung der Zellzahl	23
Abbildung 5: Anstieg der Zellzahl > 10fache	24
Abbildung 6: Kaplan-Meyer-Kurve des rezidivfreien Überlebens in Bezug zum Verhalten der Tumorzellzahl	28
Abbildung 7: Kaplan-Meyer-Kurve rezidivfreies Überleben T1 versus. T2,3,4.....	30
Abbildung 8: Kaplan-Meyer-Kurve rezidivfreies Überleben N+ versus N0	31
Abbildung 9: Kaplan-Meyer-Kurve der rezidivfreien Überlebenszeit Östrogenrezeptor positiv versus Östrogenrezeptor negativ.....	32

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungen mit deren Erläuterungen	1
Tabelle 2: Rezidivrate in Bezug zum Tumorstadium.....	25
Tabelle 3: Zusammenhang des Tumorzellzahlverhaltens mit der Entstehung eines Rezidivs am Ende der Therapie	26
Tabelle 4: Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Gruppen von Anstieg	27
Tabelle 5: Rezidivrate bei Patientinnen mit Zellanstieg	29
Tabelle 6: Rezidivrate bei Patientinnen ohne wesentliche Zellzahlveränderung.....	29
Tabelle 7: Rezidivrate bei Patientinnen mit Zellabfall	29
Tabelle 8: Höhe des Risikos zur Entstehung eines Rezidivs	29
Tabelle 9: Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von T1 versus T2,3,4	30
Tabelle 10: pT - Primärtumor	55
Tabelle 11: pN – Regionäre Lymphknoten	56
Tabelle 12: M – Fernmetastasen	57
Tabelle 13: Patientenauswahl (zeigt die demografischen Daten sowohl in Absolut- als auch in Prozentwerten).....	58
Tabelle 14: Chemotherapieschemata in Zusammenhang mit Verhalten der ZTZ	59

Lebenslauf

Nele Malarski

Geboren am 01. November 1982 in Heiligenstadt

1989-1993	Grundschule „Park“, Weimar
1993-2001	staatliches Gymnasium „Friedrich-Schiller“, Weimar
2001	Abitur
ab Herbst 2001	Beginn Hochschulstudium Humanmedizin an der Friedrich – Schiller – Universität Jena
Juni 2008	Erhalt der Approbation als Ärztin
August 2008	Beginn der Facharztausbildung im Bereich Gynäkologie und Geburtshilfe
Mai 2010	Wechsel der Facharztausbildung in die Kinder- und Jugendmedizin

Danksagung

Keine Schuld ist dringender, als die, Dank zu sagen.

Marcus Tullius Cicero (106-43 v. Chr.)

Es ist wirklich schwierig, die Dankbarkeit in Worte zu fassen, die ich den Personen schulde, die mir bei dieser Arbeit geholfen haben. Und diese sollen wissen, dass meine Dankbarkeit tiefer geht, als die folgenden Worte auszudrücken vermögen.

Ich danke meiner Betreuerin Frau Prof. Pachmann für Ihr Engagement, Ihre großzügige Hilfe, die Geduld und der guten Betreuung meiner Arbeit.

Ich danke der wissenschaftlichen Mitarbeiterin Conny Jörke für Ihre Geduld und Hilfe bei der Bearbeitung der Proben.

Ich danke meinem besten Freund Christoph Grobe, der meine Arbeit als erster gelesen und trotz anderem Fachwissen Fehler der Grammatik und der Rechtschreibung korrigierte und mir mit der Formatvorlage stets zu Seite stand. Ich danke meinem Freund Jan Schmidtsdorf, der ebenfalls meine sprachlichen Fehler korrigierte und mir stets Mut zusprach.

Außerdem danke ich meiner Schwester Anna, die zur selben Zeit promovierte, meinem Bruder Konrad, meinen Eltern Dr. Roswitha und John Malarski für die Unterstützung und Liebe, die ich all die Jahre meines Studiums erhalten habe. Ich möchte meiner Familie, meinen Freunden und auch meinem Lebensgefährten Thomas Heidecke danken, dass sie meine Launen, und damit mein ich nicht nur die guten, ertragen haben und ich bin mir dessen bewusst, dass das mitunter nicht einfach war.

Vielen Dank,

Nele Malarski

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Prof. Dr. Pachmann, Christoph Grobe, Jan Schmidtsdorf, Anna Malarski

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Nele Malarski

Weimar, den 27. Juni 2010